

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA MT1-MMP PAR LA MINOCYCLINE
ET IMPLICATION DANS L'AUTOPHAGIE DES CELLULES D'HÉPATOMES
HUMAINS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
MICHEL DESJARLAIS

MARS 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout premièrement remercier mon directeur de recherche et ami, le Dr Borhane Annabi, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ma maîtrise. J'ai eu le privilège de participer à la publication de plusieurs articles scientifiques durant mes études dans son laboratoire, et Borhane y a grandement contribué. En effet, son optimisme, sa disponibilité, son support et ses précieux conseils ont contribué à ma motivation de poursuivre ma formation scientifique au doctorat.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe de recherche, Jonathan, Amélie, Alain, Paula, Rima, Aroua, Hana, Amira et Chirine, tant pour leurs encouragements que pour leur aide au cours de mon cursus académique. Je tiens spécialement à remercier Denis, Sylvie et Julie pour leur support technique. Ce fut un honneur de faire partie de cette équipe de recherche où l'esprit d'équipe et l'enthousiasme font partie de la culture de ce laboratoire.

Je voudrais aussi remercier ma conjointe et ma fille qui ont su me donner l'énergie et la force, par leur amour, de compléter ma formation avec succès.

Pour finir, je tiens à souligner la contribution du conseil de recherches en sciences naturelles du Canada (CRSNG) pour son soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Statistiques et pronostique.....	1
1.1.2 Mécanisme de la cancérogenèse.....	5
1.1.3 Métastase et invasion tumorale	7
1.1.4 Angiogenèse tumorale.....	9
1.1.5 Régulation de l'angiogenèse	9
1.1.6 Contribution de l'inflammation dans le cancer.....	13
1.1.7 Expression et régulation de la COX-2 dans le cancer	13
1.2 Les thérapies anti-cancer	16
1.2.1 Traitements classiques.....	16
1.2.2 Spécificité des traitements.....	16
1.2.3 Chimiorésistance	19
1.2.4 Chimiothérapie moderne	21
1.3 Les métalloprotéinases matricielles	22
1.3.1 Définition et description.....	22
1.3.2 Structure, classification et activation.....	23
1.3.3 La matrice extracellulaire.....	25
1.3.4 la MT1-MMP	25
1.3.4.1 Structure et rôles biologiques	25
1.3.4.2 Mécanisme d'activation de la proMMP-2	28
1.3.4.3 Régulation à la surface membranaire	29
1.3.4.4 Régulation transcriptionnelle	32

1.3.4.5	Implication dans l'autophagie.....	33
1.4	Les inhibiteurs pharmacologiques des MMPs	33
1.4.1	Sélectivité et spécificité.....	33
1.4.2	Les inhibiteurs de la MMP-2 et de la MT1-MMP.....	33
1.4.3	Les tetracyclines.....	35
1.5	L'autophagie.....	37
1.5.1	Balance homéostatique : Double rôle.....	37
1.5.2	Rôle dans le cancer et intérêt thérapeutique	37
CHAPITRE II		
	PROJET DE RECHERCHE	41
2.1	Problématique.....	41
2.2	Hypothèses de travail.....	42
2.3	Objectifs de recherche	43
CHAPITRE III		
	THE TETRACYCLINE DERIVATIVE MINOCYCLINE ABROGATES AUTOPHAGY AND INFLAMMATION IN CONCANAVALIN-A-ACTIVATED HUMAN HEPATOMA CELLS AND REQUIRES MT1-MMP SIGNALING FUNCTIONS	44
3.1	Abstract.....	46
3.2	Introduction	48
3.3	Materials and methods.....	50
3.4	Results	53
3.5	Discussion.....	57
3.6	Acknowledgements.....	61
3.7	Figures	62
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION.....	74
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	88
	RÉFÉRENCES	91

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Statistiques sur le cancer au Canada	3
1.2 Exemples de caractéristiques permettant la classification des tumeurs	4
1.3 Caractéristiques acquises des cellules cancéreuses et étapes de la carcinogenèse	6
1.4 Résumé des étapes de formation de métastases via la circulation sanguine	8
1.5 Représentation simplifiée de la phase de croissance angiogénique	11
1.6 Le «Switch» angiogénique et les principaux récepteurs de facteur de croissances endothéliaux	12
1.7 Influence de la COX-2 dans la progression tumorale et mécanisme enzymatique	15
1.8 Cibles classiques des agents de chimiothérapies et mécanismes de résistance tumorale	21
1.9 Classification structurale moderne des MMP	24
1.10 Structure de la MT1-MMP et éléments de régulation transcriptionnelle	27
1.11 Mécanisme d'activation de la pro-MMP2	29
1.12 Résumé des 3 mécanismes de régulation de la MT1-MMP à la membrane	31
1.13 Structure de différents inhibiteurs de MMP	36
1.14 Mécanisme simplifié de la formation de vacuoles acides autophagiques	39
4.1 Les 5 principales fonctions pro-tumorales des MMPs	75
4.2 Expression génique de NANOS1 dans des tissus sains ou des tissus de tumeurs cérébrales	80
4.3 Effets de la MT1-MMP sur l'expression génique du biomarqueur pro-autophagique ATG9	84
4.4 Schéma récapitulatif de l'effet de la minocycline sur la régulation de MT1-MMP	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
4.1 Survie relative des patients atteints d'un neuroblastome exprimant ou non la MT1-MMP.....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADAM	Famille de protéine disintégrine et métalloprotéase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-4	Protéine activatrice 4
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARP101	Inhibiteur sélectif de la MMP-2
ATG	Gène relié à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
bFGF	Facteur de croissance basal des fibroblastes
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein</i>
BSA	Albumine sérique bovine
CD133	Prominin-1
CD43	Antigène de différenciation 43
CD44	<i>Hematopoietic Cell E-selectin/L-selectin Ligand</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaline A
COX	Cyclooxygénase
CSF	Facteur stimulateur de colonie
EC	Cellules endothéliales
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGCG	Epigallocatechine gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
ER	Réticulum endoplasmique
FASL	Ligand de FAS
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HepG2	Lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie

HSP	Protéine de choc thermique
HT1080	Lignée cellulaire de fibrosarcome
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50%
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun n-terminal Kinase
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chains</i>
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MDR1	<i>Multidroque résistance 1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
miR	Micro ARN
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MTCBP-1	<i>Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein 1</i>
MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle de type membranaire
mTOR	Enzyme cible de la rapamicyne chez les mammifères
NANOS1	Protéine homologue 1 de la drosophile
NF- κ B	Facteur nucléaire de transcription kappa-B
NK	Cellule tueuse naturelle « natural killer »
OMS	Organisation mondiale de la santé
P38	Protéine kinase activatrice du mitogène
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de la polymérase en chaine
PD1	Protéine de mort programmé 1
PD1	Pigment dérivé de facteur épithélium
PGE2	Prostaglandine E ₂
PGP	P-glycoprotéine
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase A

PKC	Protéine kinase C
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SB3CT	Inhibiteur de MMPs
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
siRNA	Petit ARN interférent
SNC	Système nerveux central
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SRC	<i>Rous sarcoma tyrosine kinase</i>
STAT	Transducteur du signal et activateur de la transcription
TGF β	Facteur de croissance de transformation beta
TIMPs	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	Facteur nécrosant tumoral
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
Y ⁵⁷³	Tyrosine en position 573

RÉSUMÉ

De façon moderne, le cancer pourrait être défini comme étant un ensemble de signatures moléculaires précises contribuant à l'élaboration de processus favorisant la mise en place d'un phénotype tumoral agressif. Parmi ces signatures moléculaires, la métalloprotéinase membranaire de type 1 (MT1-MMP) se démarque tant par son rôle dans le caractère invasif des tumeurs que par son implication dans diverses voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale et dans la résistance aux traitements. Reconnue surtout pour sa fonction catalytique, la MT1-MMP est surexprimée dans la plupart des cancers et contribue à la formation de métastases et à l'invasion tumorale en dégradant plusieurs composantes de la matrice extracellulaire. De plus, des études récentes ont documenté sa participation active dans plusieurs cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans la chimiorésistance et la progression tumorale. Les mécanismes en jeu demeurent toutefois peu documentés. Récemment, il a été montré que la MT1-MMP, via son domaine cytoplasmique, était impliquée dans l'inflammation et l'autophagie, deux processus cellulaires importants contribuant activement à la progression tumorale des carcinomes hépatocellulaires. Ces tumeurs malignes représentent la cinquième cause de mortalité par le cancer au niveau mondial. Leur croissance est favorisée par un microenvironnement inflammatoire chronique et un niveau d'autophagie élevé contribuant à la chimiorésistance et rendant la plupart des traitements inefficaces. En effet, l'autophagie est un mécanisme de dégradation lysosomale qui permet un apport énergétique complémentaire à l'angiogenèse favorisant la croissance des tumeurs. L'autophagie intervient également en réparant les organelles endommagées par des agents thérapeutiques permettant à certaines cellules de survivre et favorisant une chimiorésistance tumorale secondaire. Nous avons donc utilisé un modèle cellulaire HepG2 représentatif des hépatomes afin d'étudier l'implication de la MT1-MMP dans ces processus. Il devient donc impératif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de signalisation impliqués entre la MT1-MMP, l'inflammation et l'autophagie, dans le but d'améliorer les modalités thérapeutiques envers les hépatomes par un ciblage pharmacologique plus précis. La minocycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines, est généralement utilisée pour son action bactériostatique et anti-inflammatoire. Elle possède également la capacité d'inhiber l'expression génique de la MT1-MMP.

La première partie de mon mémoire a pour objectif d'étudier la régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP ainsi que de ses fonctions de signalisation dans l'inflammation et l'autophagie dans les cellules HepG2. Nous avons donc stimulé l'expression de la MT1-MMP par la concanavaline A (ConA), une lectine reconnue pour induire un phénotype inflammatoire et autophagique. Nous confirmons que la MT1-MMP est effectivement requise dans l'induction du phénotype inflammatoire et autophagique par la ConA. En effet, l'induction par la ConA du biomarqueur inflammatoire COX-2, ainsi que la formation de vacuoles acides et du biomarqueur autophagique BNIP3 sont antagonisés lorsque l'expression de la MT1-MMP est réprimée. NANOS1 et STAT3 ont été identifiés comme régulateurs transcriptionnels de la MT1-MMP dans son mécanisme d'induction par la ConA. Nous mettons également en évidence l'implication d'un axe de signalisation entre NANOS1 et STAT3. Finalement, nos résultats suggèrent que la minocycline antagonise l'induction de vacuoles acides et l'expression de BNIP3 et COX-2. La minocycline inhibe directement

l'expression génique de NANOS1 et MT1-MMP dans une condition basale sans traitement à la ConA et elle empêche la phosphorylation de STAT3 induite par la ConA. À la lumière de nos résultats, nous mettons donc en évidence un nouveau mécanisme d'action de la minocycline dans la cascade de signalisation induite par la ConA et impliquant MT1-MMP. Nous suggérons aussi de poursuivre l'étude de l'évaluation de la minocycline dans le traitement des hépatomes humains.

Mots clés : MT1-MMP, NANOS1, Hépatome, Autophagie, Inflammation, ConA, Minocycline

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Statistiques et pronostique

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité au niveau mondial, ce qui en fait une priorité dans la recherche médicale moderne. En effet, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est à l'origine de 7.6 millions de décès annuellement et devrait dépasser la barre des 16 millions de décès en 2030. Si l'on regarde de plus près les statistiques de l'OMS, 70% des décès par cancer sont survenus dans des pays à faibles revenus. Il est alors possible de penser que l'efficacité limitée des traitements en place, couplée à des budgets plus limités en recherche est en cause. Il est également pertinent de mentionner que 30% des cancers sont attribuables à 5 principaux facteurs de risque comportementaux, soit : un indice de masse corporelle élevé, une faible consommation de fruits et légumes, un manque d'exercice physique, au tabagisme et à une consommation d'alcool (Danaei et al, 2005; Rajarajeswaran et Vishnupriya, 2009). 70% des cancers restants sont donc de nature aléatoire. Si l'on observe la situation en chiffre au Canada (Figure 1.1a), 187 000 Canadiens recevront un diagnostic de cancer en 2013 et 37% vont en mourir (Société Canadienne du Cancer). En constatant l'ampleur de la situation, il devient donc impératif d'accentuer les recherches en vue d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogénèse. Ceci permettra le développement d'agents pharmacologiques et de traitements thérapeutiques d'efficacité supérieure.

La répartition des types de cancer est très variable selon l'âge des personnes atteintes. En effet, le cancer du système nerveux central (SNC) représente la deuxième cause de cancer (19% des cas) chez les sujets âgés de 0 à 14 ans, alors qu'il représente moins de 5% des cancers entre 15 et 70 ans (Statistique Canada, 2013). Si l'on compare les autres types de cancer, il est facile de constater une grande variabilité, ce qui indique que l'âge est un facteur

important dans le développement de certains cancers. Les pronostics de survies sont également très variables selon le type cancer. La moyenne de rémission est d'environ 63% sur 5 ans tous cancers confondus. L'évolution de la recherche et des progrès technologiques ont permis aux personnes atteintes d'un cancer de voir leurs taux de survie augmenter de 7%, entre 1992 et 2008 (Figure 1.1b).

Selon la Société Canadienne du Cancer, plusieurs facteurs peuvent influencer le taux de mortalité. Il s'agit en fait d'une combinaison de variables complexes selon le type de cancer. Parmi ces variables, cinq facteurs ont un impact significatif sur le taux de mortalité (OMS). 1) la catégorie histologique de la tumeur (Figure 1.2a), qui regroupe les différentes composantes de la tumeur (Pichler et al, 2012); 2) le stade de la tumeur, qui comprend l'emplacement et la taille de la tumeur qui sont des facteurs déterminants du taux de survie relatif (Figure 1.2c). Par exemple, un cancer confiné dans son organe d'origine, sera moins invasif qu'un cancer qui s'est propagé dans un emplacement éloigné (Farias-Eisner et al, 1994); 3) le modèle de croissance de la tumeur (Koontongkaew, 2013); 4) le stade de dépistage du cancer (Figure 1.2b), la présence et l'absence de symptômes et marqueurs tumoraux ont une grande influence. Par exemple, l'absence de symptômes et le diagnostic à un stade tardif du cancer du pancréas, sont les principales causes du faible taux de survie (Mysliwiec et Kedra, 2008); 5) le choix du traitement et la réaction au traitement du sujet. Le choix initial de traitement est crucial, par exemple, un traitement trop faible de chimiothérapie peut engendrer un phénomène de chimiorésistance qui va diminuer l'efficacité des futures doses administrées. En effet, la cellule cancéreuse résistante sera alors capable de rejeter l'agent pharmacologique. Les conséquences de ce rejet forceraient à utiliser des doses plus élevées mais moins efficaces, jusqu'au point d'atteindre une dose létale pour l'individu (Foo et Michor, 2010).

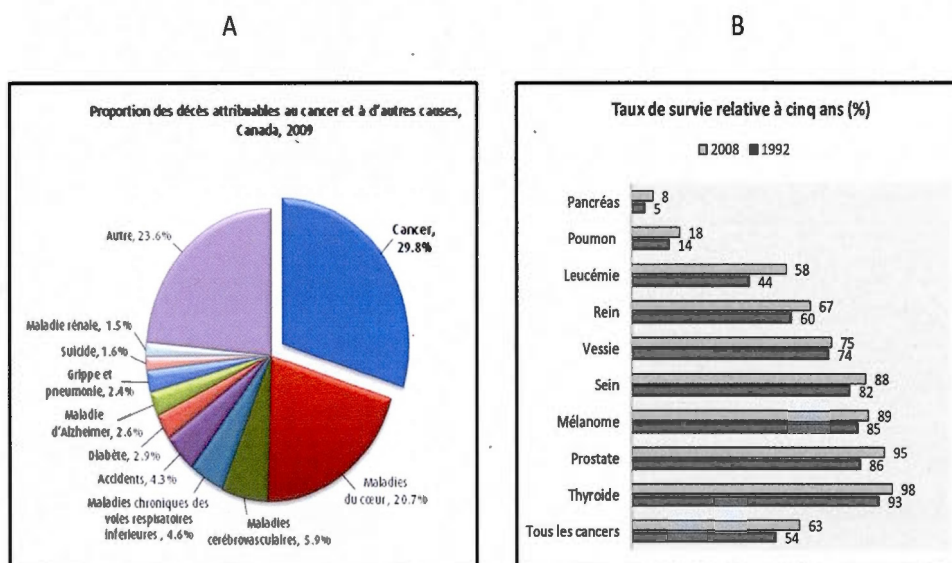


Figure 1.1 : Statistiques sur le cancer au Canada. A) Principales causes de mortalités en 2007. B) Évolution du taux de survie relative à 5 ans par type de cancer entre 1992 et 2008.

[Adapté de Statistique Canada]

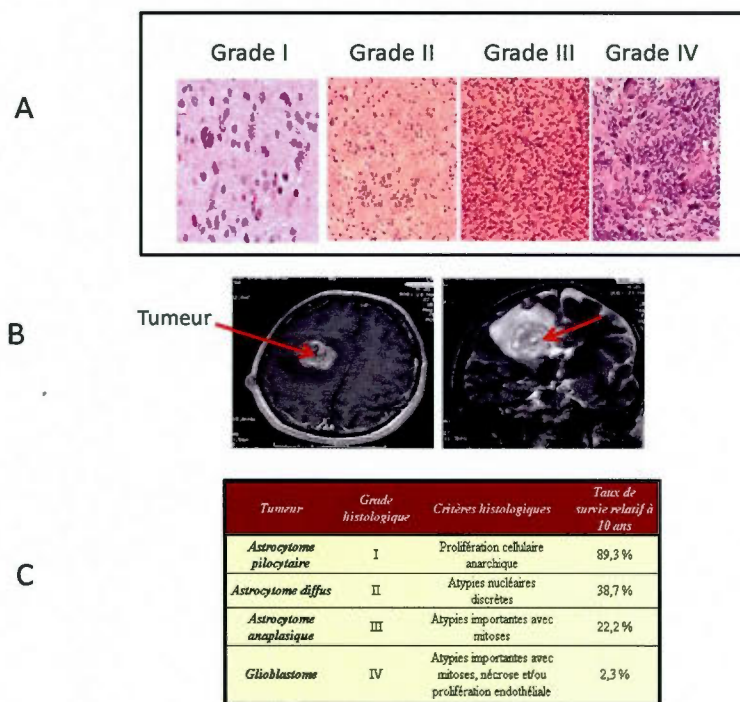


Figure 1.2 : Exemples de caractéristiques permettant la classification des tumeurs. A) Analyse histologique de tissus cérébraux présentant des tumeurs 1) Tumeur modérément composée d'astrocytomes uniformes. 2) Astrocytomes hyperchromatiques avec noyaux irréguliers. 3) Astrocytomes avec anaplasie de haut grade 4) Glioblastomes à cellules géantes. B) Imagerie par résonnance magnétique cérébrale de glioblastome à cellules géantes. C) Exemple de classification de tumeurs cérébrales en fonction des critères histologiques et taux de survie à 10 ans.

[Adapté de Gomori et al, 2012; Lrhezzioui et al, 2007]

1.1.2 Mécanisme de la cancérogenèse

Le cancer peut être défini comme une maladie caractérisée par une perte de régulation de la cellule elle-même, qui se traduit par une prolifération cellulaire incontrôlée au sein d'un tissu normal de l'organisme. Cette prolifération anarchique va menacer la survie de ce tissu. Les cellules cancéreuses proviennent toutes d'un même clone d'origine, c'est-à-dire par divisions successives d'une seule cellule transformée ou maligne. En effet, la transformation phénotypique d'une cellule saine en cellule cancéreuse est caractérisée par six changements biochimiques fondamentaux (Hanahan et Weinberg, 2011) : 1) Perte de régulation des signaux de la prolifération cellulaire; 2) Insensibilité aux signaux antiprolifératifs; 3) Capacité de réplication illimitée (immortalisation); 4) Capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée (apoptose); 5) Capacité de néoangiogenèse; 6) Acquisition d'un potentiel invasif et métastatique (figure 1.3a).

Le processus de cancérogenèse correspond chronologiquement à l'altération de la cellule saine jusqu'à la tumeur. Il s'agit d'un processus complexe séparé par trois étapes distinctes: l'initiation, la promotion et la progression (Hennings et al, 1993; Moustacchi, 1998). L'initiation (étape irréversible) est la phase initiale qui ne concerne qu'une seule cellule qui a subi des altérations génétiques par des agents carcinogènes (chimiques, physiques ou génétiques). En effet, ces altérations vont résulter en un gain ou une perte de fonctions cellulaires comme l'activation ou la répression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs. La conséquence ultime sera la perte d'homéostasie et l'immortalisation cellulaire. Dans la deuxième étape (promotion), la cellule acquiert par mutations successives des caractéristiques qui vont lui permettre de créer un cancer, c'est le stade d'expansion clonale. En effet, c'est au cours de cette étape que les cellules « initiées », ayant échappé au processus de réparation ou de mort, vont proliférer. Cette prolifération anarchique est alors consécutive de nouvelles mutations de l'ADN qui sont causées par différents agents promoteurs tels que le tabac, radiation, agents hormonaux, etc. Cette étape est toutefois réversible. À ce stade, on dit que le cancer est infraclinique, car l'environnement des cellules cancéreuses est non coopératif. En effet, l'environnement des cellules cancéreuses ne fournit pas les nutriments et le soutien requis pour leur développement. Le cancer n'évolue pas ou

très lentement à ce stade. Dans la dernière étape, que l'on nomme progression ou tumorigénèse, les cellules filles du clone transformé sont sélectionnées pour donner des clones malins qui auront la possibilité d'acquérir des propriétés leur permettant de coloniser d'autres sites que leurs emplacements originaux, c'est le phénomène de métastase. Il s'agit du développement du cancer donnant des signes cliniques.

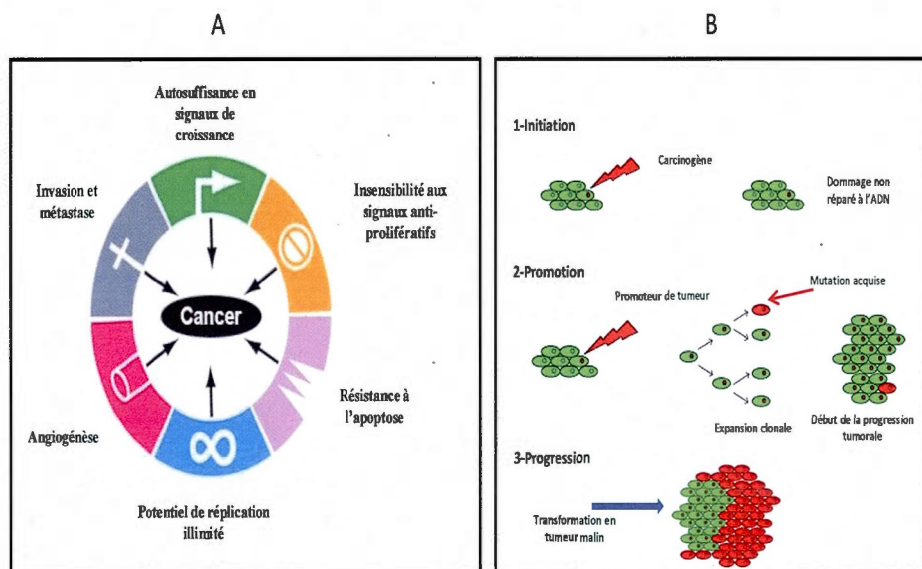


Figure 3 : Caractéristiques acquises des cellules cancéreuses et étapes de la carcinogénèse. A) Les 6 principales caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses qui les différencient des cellules normales. B) Les 3 étapes chronologiques de la carcinogénèse. La première étape consiste en une agression de la cellule saine par un carcinogène qui cause une lésion à l'ADN qui ne sera pas réparé. Dans la seconde étape (promotion), la cellule initiatrice (clone), sous l'action d'agents promoteurs de tumeurs, va être sélectionnée. La dernière étape est la phase de progression, elle est caractérisée par une cellule ayant acquise toutes les caractéristiques requises pour son développement en tumeur maligne.

[Adapté de Centelles, 2012; Hanahan et Weinberg, 2011]

1.1.3 Métastase et invasion tumorale

Les métastases cancéreuses correspondent à la croissance d'une cellule tumorale à distance du site original, formant des foyers tumoraux secondaires. En effet, les cellules cancéreuses peuvent se détacher et migrer dans d'autres organes, via la circulation lymphatique et/ou sanguine (Suyama et al, 2004). La formation de métastases requiert plusieurs processus dont l'invasion tumorale souvent confondue à tort avec le terme métastase. L'invasion tumorale est une étape distincte qui est définie comme la capacité des cellules cancéreuses à infiltrer les tissus avoisinants (Leber et Efferth, 2009; Yamaguchi et al, 2005). La première étape de l'invasion locale est le franchissement de la membrane basale qui va permettre aux cellules cancéreuses d'envahir des structures tissulaires proches. Le mécanisme d'invasion met en jeu principalement trois mécanismes clefs (Figure 1.4): 1) L'interaction des cellules cancéreuses avec les composantes de la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses vont alors modifier leur ancrage à la matrice extracellulaire. Morphologiquement, le tissu sain est composé de cellules liées entre elles et à la matrice extracellulaire par des systèmes de jonctions et des molécules d'adhésion. La modification des niveaux d'expression de molécules d'adhésion résultant en une diminution des jonctions intercellulaires modifie l'ancrage cellulaire. 2) Dégradation de la matrice extracellulaire : la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire est réalisée par l'intervention de certaines enzymes protéolytiques matricielles (MMP) sécrétées par les cellules cancéreuses. 3) Migration des cellules cancéreuses. La migration des cellules cancéreuses fait intervenir une accumulation de microfilaments sous la membrane plasmique qui va permettre des déplacements par pseudopodes. Les cellules qui ont réussi à franchir la membrane basale pourront migrer à proximité des vaisseaux sanguins et être véhiculées vers un nouveau tissu (Friedl et Wolf, 2003; Kramer et al, 2013).

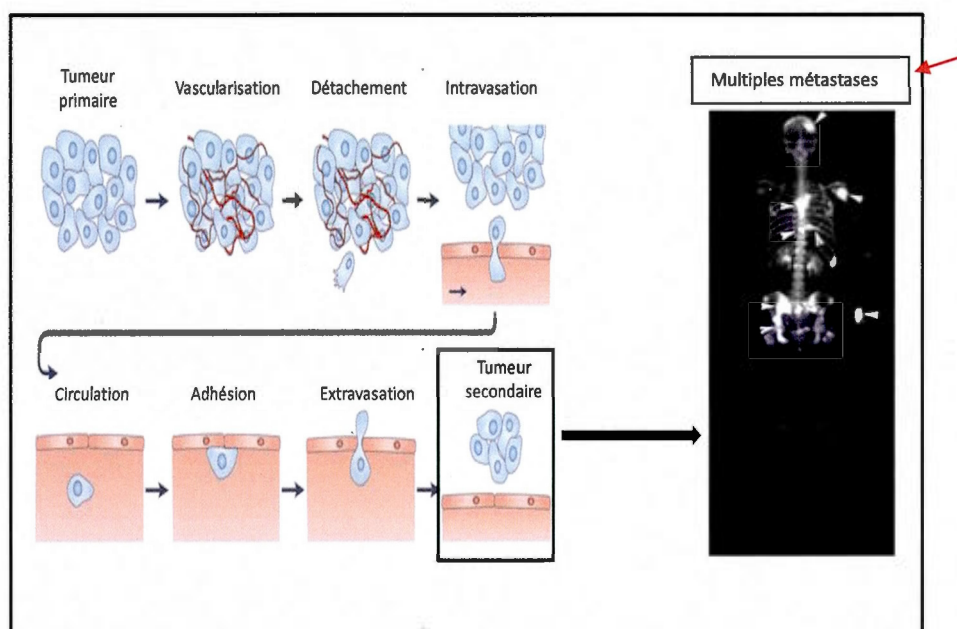


Figure 1.4 : Résumé des étapes de formation de métastases via la circulation sanguine.

Dans un premier temps, la tumeur primaire va subir une vascularisation nécessaire à sa croissance. La cellule cancéreuse va dans un deuxième temps se détacher et migrer à l'intérieur du vaisseau sanguin, ce phénomène est appelé intravasation. La cellule via la circulation sanguine pourra alors venir adhérer à un site secondaire et pénétrer les tissus par extravasation. Une tumeur secondaire est alors formée.

[Adapté de Wirtz et al, 2011]

1.1.4 Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est définie comme étant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants, on parle alors de néovascularisation. Il s'agit d'un processus physiologique important permettant la formation du réseau vasculaire, qui est indispensable pour alimenter les tissus en oxygène et en nutriments, via la circulation sanguine. En effet, l'angiogenèse est importante non seulement pour l'embryogenèse, mais également pour les processus de réparation tissulaire post-traumatiques (Papetti et Herman, 2002). Toutefois, elle devient pathologique notamment dans le cancer où elle permet à la tumeur de s'alimenter et de grossir. La prolifération des cellules tumorales provoque leur éloignement de la circulation sanguine et par conséquent, lorsque la tumeur atteint une certaine taille ($1-2 \text{ mm}^3$), elle n'est plus alimentée convenablement ce qui provoque son arrêt de croissance (Papetti et Herman, 2002). Afin que la croissance se poursuive, les tumeurs doivent acquérir une capacité de stimulation angiogénique. L'angiogenèse est donc peu présente dans la phase pré-invasive, mais devient massive lors de la phase invasive et métastatique. On appelle ce passage «Switch» angiogénique (Bergers et Benjamin, 2003).

1.1.5 Régulation de l'angiogenèse

Les tumeurs ayant atteint la taille critique de $1-2 \text{ mm}^3$ vont dépendre de leur capacité angiogénique afin de poursuivre leur croissance. Seulement une faible proportion des tumeurs dormantes va entrer dans cette phase de croissance (figure 1.5). Le «Switch» angiogénique est principalement contrôlé par un équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques de l'environnement tumoral (Figure 1.6a) (Baeriswyl et Christofori, 2009). Le mécanisme précis demeure toutefois encore mal compris et plusieurs questions demeurent encore sans réponse. En effet, on ne sait toujours pas quel est l'événement initiateur du «Switch» angiogénique ni également pourquoi certaines cellules restent en quiescence alors que d'autres progressent (Bergers et Benjamin, 2003).

L'hypoxie est le principal signal déclencheur de l'angiogenèse. En effet, le manque en oxygène des cellules cancéreuses va causer un déséquilibre qui va déclencher des voies

métaboliques adaptatives complexes régulées par des protéines de la famille des HIF «hypoxia inducible factor». Les HIF sont synthétisées et dégradées en permanence dans des conditions physiologiques normales par des hydroxylases qui nécessitent de l'oxygène pour fonctionner. Dans des conditions d'hypoxie, les HIF ne sont plus dégradées par ces enzymes non fonctionnels et elles seront alors transloquées vers le noyau cellulaire où elles se fixeront sur différentes régions régulatrices de l'ADN (Breier et al, 2007; Pugh et Ratcliffe, 2003). Parmi ces régions régulatrices, le HIF va induire la transcription du Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui est présent en plusieurs isoformes et constitue le facteur de croissance clé dans le processus angiogénique. Les cellules cancéreuses vont alors sécréter le VEGF dont la liaison à son récepteur VEGFR enclenchera le processus de néovascularisation. Les récepteurs du VEGF sont des récepteurs à activité tyrosine kinase présents sous différentes isoformes (Figure 1.6b) à la surface des cellules (Ferrara et al, 2003). Il existe un marché spécifique pour la synthèse d'inhibiteurs pharmacologiques contre les différents récepteurs VEGFR. En effet, leur inhibition spécifique permettrait de bloquer le processus de vascularisation et par conséquent d'empêcher la tumeur de s'alimenter (Moreira et al, 2007). La famille des métalloprotéinases matricielles (MMP) joue également un rôle important au niveau de l'angiogenèse. Non seulement ces MMPs sont indispensables à la dégradation de la MEC, mais elles permettent également la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques (Rundhaug, 2005).

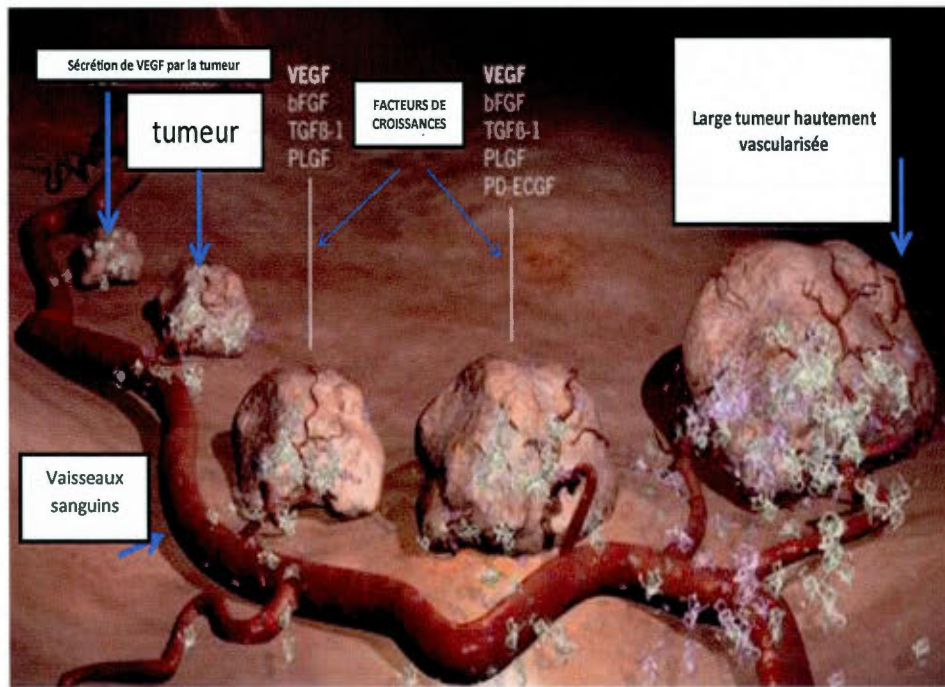


Figure 1.5 : Représentation simplifiée de la phase de croissance angiogénique. La tumeur en hypoxie va sécréter le facteur de croissance VEGF qui va se lier à son récepteur VEGFR et initier une cascade de signalisation menant à la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins. La tumeur sera alors alimentée de façon appropriée et pourra poursuivre sa croissance.

[Adapté de Bergers et Benjamin, 2003]

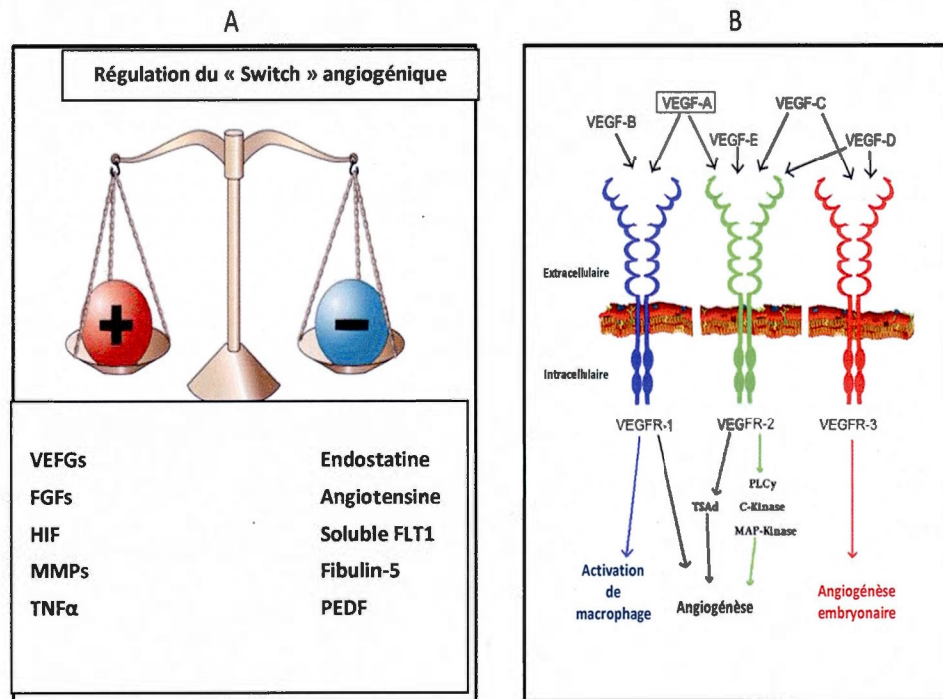


Figure 1.6 : Le «Switch» angiogénique et les principaux récepteurs de facteur de croissances endothéliaux. a) Les principales molécules activatrices et inhibitrices impliquées dans la balance angiogénique. b) Les 3 principaux récepteurs de la famille VEGFR et leurs principaux ligands. VEGFR1 et VEGFR2 sont les principaux récepteurs impliqués dans l'angiogénèse tumorale. Une fois activés, ils vont initier une cascade de signalisation permettant d'initier l'angiogénèse.

[Adapté de Shibuya, 2006; Zetter, 2008]

1.1.6 Contribution de l'inflammation dans le cancer

L'inflammation aiguë est un processus immunitaire de défense de l'organisme face à diverses agressions: agents pathogènes (bactéries, virus), allergie, brûlure, traumatisme (Medzhitov, 2008). Elle est caractérisée par cinq signes cliniques communs, soient, une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, de la douleur et par une altération de la partie inflammée. Le mécanisme inflammatoire comporte deux étapes, une phase vasculaire et une phase cellulaire (Eming et al, 2007; Libby, 2007). La phase vasculaire permet une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. La phase cellulaire est caractérisée par une vasodilatation locale qui a pour conséquence d'augmenter l'afflux sanguin à la région touchée et permet le transport massif de molécules nécessaires à la guérison. Toutefois, lors de l'inflammation chronique, le processus inflammatoire se prolonge tant que les stimuli persistent et sont à l'origine de nombreuses maladies telles que l'obésité, les troubles cardiovasculaires, immunitaires, la dégénérescence du système nerveux central et le cancer (Wu et al, 2013). Plusieurs études ont montré un lien étroit entre une inflammation chronique et divers cancers (Coussens et Werb, 2002). En effet, le système inflammatoire peut contribuer de plusieurs façons à la cancérogenèse et à l'agressivité de divers cancers (Figure 1.7a). Par exemple, le cancer du foie survient fréquemment dans un contexte d'inflammation des tissus hépatiques qui va engendrer l'émergence de cellules tumorales (Berasain et al, 2009). Parmi les nombreux mécanismes proposés, l'inflammation induirait l'expression d'un micro-ARN (miR-155) qui est impliqué dans la régulation de nombreux processus de réparation de l'ADN, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter le nombre de mutations géniques favorisant l'apparition de cancer (Tili et al, 2011).

1.1.7 Expression et régulation de la COX-2 dans le cancer

La protéine Cox-2 fait partie de la famille des cyclo-oxygénases qui comporte trois isoformes (Cox-1, Cox-2 et Cox-3). Cox-1 et Cox-2 possèdent des structures similaires et convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine (PGE₂) impliquée dans la réponse inflammatoire (Figure 1.7b). La première est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus, alors que la deuxième est inductible par diverses molécules pro-inflammatoires et

exprimée seulement dans certains tissus (Seibert et Masferrer, 1994). La Cox-3 découverte récemment serait non fonctionnelle ou très peu exprimée chez l'humain selon certains chercheurs (Schwab et al, 2003). Selon plusieurs études, la COX-2 est surexprimée dans différents cancers et contribue à plusieurs étapes de la cancérogenèse. En effet, sa surexpression augmenterait l'invasion tumorale (Gee et al, 2008) et, plus important encore, serait impliquée dans la formation de métastases (Fisher et al, 2011).

L'expression de la COX-2 est finement régulée par plusieurs voies de signalisation impliquant des molécules telles que: MAPK, PKC, PKA, JNK et P38 (Cui et al, 2004; Wu et al, 2006). Ces grandes voies ont en commun de converger vers la synthèse d'AMPc contribuant de façon indirecte à l'activation de COX-2 par modulation NF-kB (Kim et al, 2009). En effet, un excès d'AMPc augmente la transcription d'IKK dont son rôle est d'activer par phosphorylation IKappaB, un régulateur négatif de NF-kB, qui sera par la suite dégradé. Cette levée d'inhibition par IKappaB va conduire à la translocation de NF-kB dans le noyau activant la transcription de COX-2 par liaison sur son promoteur. Certaines molécules comme STAT-1 peuvent venir bloquer la transcription et par conséquent réguler la production de COX-2 (Zhang et al, 2007). Récemment, des études ont démontré que la MT1-MMP qui est impliquée dans plusieurs processus importants dans l'invasion tumorale régulerait également l'expression de COX-2 (Sina et al, 2010). La contribution de la MT1-MMP à l'expression de la COX-2 en fait une nouvelle cible pharmacologique dans le développement de molécules anti-inflammatoires.

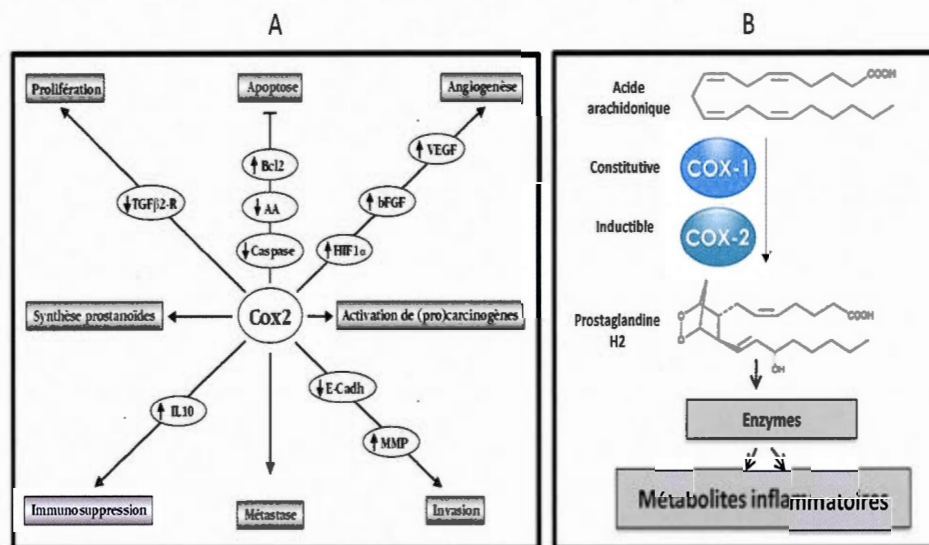


Figure 1.7 : Influence de la COX-2 dans la progression tumorale et mécanisme enzymatique. A) COX-2 est impliquée dans la synthèse d'un ensemble d'intermédiaires de signalisation et de pro-carcinogènes. Elle se comporte comme un promoteur de tumeurs et participe à différentes étapes de la carcinogénèse en favorisant la survie et la prolifération cellulaires, l'immunosuppression, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et les métastases. B) La COX-1 exprimée de façon constitutive et la COX-2 de façon inductible, catalysent tous deux la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ qui sera par la suite transformée en divers métabolites pro-inflammatoires par diverses enzymes.

[Adapté de Rodrigues et al, 2009]

1.2 Les thérapies anti-cancer

1.2.1 Traitements classiques

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses possibilités de traitements contre le cancer qui vont dépendre de plusieurs facteurs dont le type du cancer, son stade de progression, son agressivité et les chances de survie. Les traitements seront choisis en fonction de ces différents critères et également en fonction de l'âge et de l'état de santé générale du patient. Les oncologues doivent également déterminer le but ultime du traitement qui peut être préventif, curatif, ou palliatif. Les traitements peuvent être locaux et l'on se concentre alors sur une partie spécifique du corps, alors qu'un traitement systémique va atteindre toutes les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme via la circulation sanguine. Dans certains cas, le praticien aura recours à un traitement ciblé qui a pour but d'atteindre les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines. Les traitements sont choisis en général parmi six grandes classes soit : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et autres traitements qui comprennent notamment l'iode radioactif, les thérapies cellulaires et angiogéniques (société canadienne du cancer).

1.2.2 Spécificité des traitements

La chirurgie est largement utilisée dans les cas de tumeurs localisées. Elle consiste en l'ablation de la tumeur et permet également d'évaluer la gravité et l'étendue du cancer. L'avancée des techniques chirurgicales fait en sorte qu'elle est devenue beaucoup moins invasive que par le passé. En effet, la chirurgie moderne permet d'enlever avec une grande précision la tumeur tout en préservant l'intégrité des tissus non atteints. Toutefois, il y a toujours un risque d'infection post opératoire et également un risque lié à l'anesthésie. Souvent la chirurgie est accompagnée d'un traitement secondaire comme la radiothérapie et/ou la chimiothérapie pour minimiser les récives (Bhatnagar et Sarin, 2010; Goldfarb et al, 2010).

La chimiothérapie consiste en l'administration de divers agents chimiques, dont l'objectif est de détruire les cellules cancéreuses par divers mécanismes et qui va en général impliquer un dérèglement du cycle cellulaire ou affecter la synthèse d'ADN (Donnelly, 2004). Les principales catégories d'agents utilisés sont les suivantes (Figure 1.8a): agents alkylants, agents dérégulant le métabolisme, alcaloïdes d'origine végétale, inhibiteurs d'enzymes impliqués dans la réplication d'ADN et antibiotiques anti-tumoraux (Kontos et al, 2013). La durée du traitement est très variable et fonction du type de cancer. La chimiothérapie peut être également utilisée en post opération pour éviter les récives et dans les cas de métastases. La chimiothérapie représente également une bonne option quand la tumeur est inopérable. Les effets secondaires liés à la chimiothérapie sont multiples : fatigue importante, nausée, vomissement, problème digestif et perte de cheveux. Tous ces effets sont en général causés par le manque de spécificité des agents chimiothérapiques (Kawazoe et al, 2006; Lindley et al, 1999). En effet, les agents pharmacologiques sont rarement spécifiques à une seule cible, ils affectent donc des cibles secondaires impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Liang et al, 2010). La chimiothérapie peut être considérée comme un traitement avec «dommages collatéraux» et l'on doit alors tenir compte du rapport risque/bénéfice. L'avancée de la science fait en sorte qu'il est possible de constater une augmentation importante de l'efficacité et une diminution des effets secondaires en chimiothérapie. En effet, l'utilisation des traitements par chimiothérapie a augmenté de 24% au niveau mondial entre 2005 et 2010 (Zaman et al, 2005).

La radiothérapie permet une destruction des cellules cancéreuses par irradiation qui va endommager et modifier le génome de la cellule et ultimement freiner sa prolifération. La dose est très importante car elle doit endommager suffisamment l'ADN pour que la cellule soit incapable de se réparer, tout en minimisant la destruction des cellules saines environnantes. La durée du traitement est variable selon la grosseur de la tumeur, mais dure en moyenne un à deux mois à raison de cinq jours par semaine. Ce type de traitement est souvent utilisé en pré et post opération (société canadienne du cancer). Il existe plusieurs effets secondaires classiques associés à l'irradiation des patients, mais le plus important est l'apparition d'un deuxième cancer dans certains cas (Yock et Caruso, 2012).

Dans le cas de certains cancers hormonaux dépendants, comme celui de la prostate et du sein, l'hormonothérapie peut être utilisée. Les cellules cancéreuses vont développer des récepteurs spécifiques qui pourront être bloqués par certains agents synthétiques. L'intervention avec ce type d'agents, va empêcher la progression tumorale en modifiant l'influence des hormones sur la division cellulaire. Les effets secondaires classiques sont donc liés au cycle hormonal de l'individu. Ils peuvent chez l'homme provoquer une impuissance ou un dérèglement du cycle menstruel chez la femme (Jones et Buzdar, 2004; Labrie, 2010). Toutefois, il est également possible de voir des effets secondaires cognitifs qui peuvent affecter la qualité de vie des patients, les hormones peuvent donc intervenir à plusieurs niveaux sur le SNC (Nelson et al, 2008).

L'immunothérapie est une méthode astucieuse et prometteuse, mais très peu utilisée présentement comparativement aux autres traitements classiques. Son principe consiste à former et stimuler nos propres défenses immunitaires afin d'attaquer la cellule cancéreuse (Schuster et al, 2006). Il s'agit plutôt d'un traitement de dernier recours qui peut être par exemple utilisé lors de tumeurs de très mauvais pronostic, tels que des mélanomes invasifs (Saleh et al, 2005) et dans le cas de cancers du poumon avancés (Nemunaitis, 2009). Plusieurs essais cliniques ont montré de bons résultats et même des régressions tumorales importantes de l'ordre de 49-72% pour les mélanomes (Rosenberg, 2011). Une des premières caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à échapper au système immunitaire. Pour ce faire, elles ont la capacité d'inactiver les lymphocytes T qui sont normalement chargés de les éliminer, en utilisant des protéines telles que Pd1 ou PdL1 (West et al, 2013). L'injection d'anticorps ou la vaccination avec un antigène PdL1 permettrait d'empêcher l'inactivation des lymphocytes T (Aerts et Hegmans, 2013). Un des principaux problèmes de ce type de traitement est lié à une réponse exagérée du système de défense de l'organisme à l'origine de maladies secondaires immunitaires (Amos et al, 2011).

La dernière catégorie de traitement est très ciblée en fonction d'un cancer ou d'un processus spécifique. Par exemple, l'iode radioactif est utilisé pour le cancer de la thyroïde après son ablation chirurgicale (Anderson et al, 2013). Les thérapies cellulaires consistent à injecter des cellules comme dans le cas d'une greffe de la moelle osseuse. Elles permettent également

la stimulation du système immunitaire ce qui pourrait mener à une vaccination contre certains cancers (June, 2007; Krug, 2004). Les traitements anti-angiogéniques sont assez récents et permettent de bloquer le processus d'angiogenèse nécessaire à la croissance de la tumeur solide. Les agents utilisés ne se limitent pas seulement au VEGF et à ses récepteurs, mais ciblent plusieurs molécules impliquées dans divers étapes du processus angiogénique et font maintenant partie de l'arsenal thérapeutique moderne. La recherche de nouvelles cibles et le design d'antagonistes et d'inhibiteurs passent par une meilleure compréhension des voies de signalisation impliquées (Clarke et Hurwitz, 2013).

1.2.3 Chimiorésistance

L'efficacité des traitements pharmacologiques n'est pas seulement fonction des paramètres habituels soit, la dose, la toxicocinétique et la réponse du patient au traitement. Il existe en effet des phénomènes de résistance qui permettent à la cellule cancéreuse de contourner les mécanismes d'action des drogues utilisées. Il existe deux catégories de chimiorésistance, la résistance primaire et la résistance secondaire (Zucker et Cao, 2009). Dans la résistance primaire, la cellule cancéreuse possède déjà une résistance innée, ce type de résistance est moins fréquent (Lin et Bivona, 2012). La résistance secondaire correspond à l'acquisition de résistance après le traitement initial (Misale et al, 2012). Les mécanismes de chimiorésistance tumorale sont très nombreux (Figure 1.8b) et peuvent permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort de différentes façons. En effet, les cellules cancéreuses peuvent amplifier la transcription de certains gènes codant pour des protéines capables d'inhiber ou de dégrader l'agent pharmacologique. Les cellules cancéreuses sont également capables de modifier leur métabolisme pour accélérer le catabolisme de la substance et par conséquent la vitesse de dégradation de la drogue. Plus important encore, une augmentation à la hausse du niveau d'expression de certains transporteurs membranaires permet de diminuer la pénétration de la drogue dans la cellule. Ce type de mécanisme rend la cellule cancéreuse totalement résistante face aux agents pharmacologiques nécessitant un système de transport. L'expulsion de l'agent pharmacologique peut également être modulée par une augmentation de l'expression de différents canaux membranaires impliqués dans la clairance de la drogue (Fisher et Mobashery, 2006). Un des mécanismes d'expulsion les plus

fréquents et également des plus efficaces pour la survie des cellules cancéreuses, autant que pour les résistances primaires que secondaire, est le système MDR «multidrug resistance » (Mechetner et al, 1998). Le gène MDR1 est responsable de ce phénomène, il s'agit d'un gène conservé au cours de l'évolution codant pour une protéine transmembranaire appelée P glycoprotéine (PGP). Cette protéine agit en tant que pompe ATPase capable d'expulser certains substrats en consommant de l'ATP (Seals et Courtneidge, 2003). L'exposition de la cellule cancéreuse face à une substance chimique peut induire l'expression de la PGP faiblement exprimée en temps normal, ce qui a pour conséquence de rendre la cellule cancéreuse résistante face à cette classe de drogue. L'importance d'un choix judicieux dans la dose administrée est nécessaire pour minimiser ce phénomène.

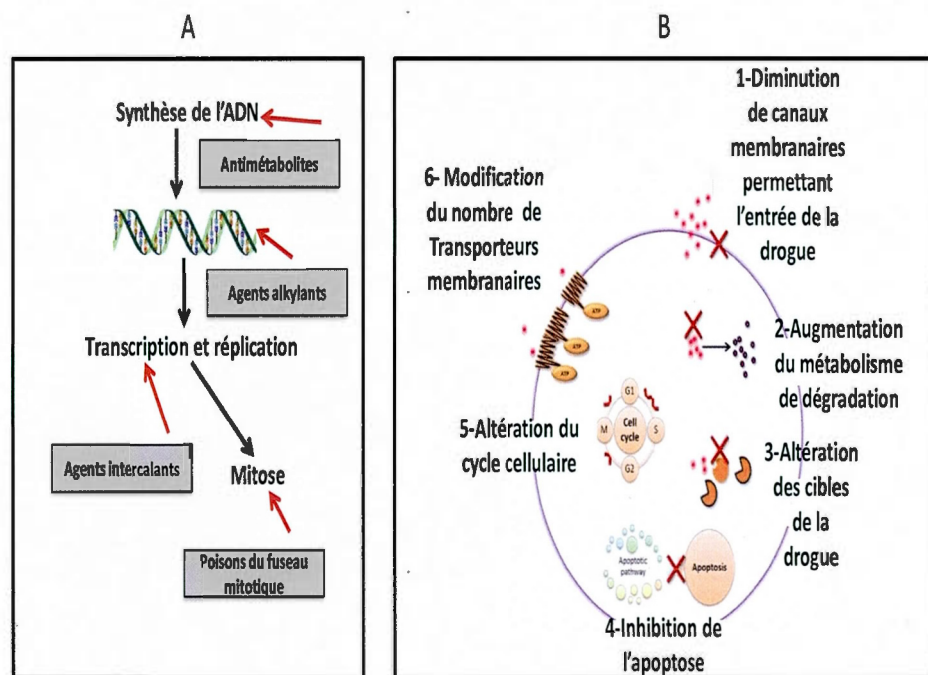


Figure 1.8 : Cibles classiques des agents de chimiothérapies et mécanismes de résistance tumorale. a) Principales cibles moléculaires des agents de chimiothérapies classiques (flèche rouge). b) Résumé des 6 principaux mécanismes adaptatifs des cellules cancéreuses générant une résistance face à une drogue.

[Adapté de Chai et al, 2010; Gilligan et Kantoff, 2002]

1.2.4 Chimiothérapie moderne

Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques capables de bloquer la transduction des signaux cellulaires à divers niveaux et impliqués dans divers processus clés pour la survie de la cellule, est un axe de recherche très prometteur. En effet, la plupart des traitements courants de chimiothérapie ciblent des processus communs, comme la réplication cellulaire et la biosynthèse d'ADN. Le réseau de signalisation cellulaire offre l'opportunité de cibler

divers niveaux d'un processus, en réprimant des signaux d'activation entre deux molécules, ce qui peut mener au dysfonctionnement du processus ciblé. Le cancer est avant tout une maladie du contrôle cellulaire et de la prolifération. En effet, les voies de communication via des cascades signalétiques se trouvent altérées. Elles sont, en majorité, contrôlées par des protéines kinases qui ont pour fonction d'activer d'autres molécules par phosphorylation. Dans les cellules cancéreuses, les kinases sont souvent mutées, ce qui leur confère la propriété de sur-stimuler certains systèmes impliqués dans le cycle cellulaire (Rossello et al, 2004). Il devient donc impératif de mieux comprendre l'échange de signaux au niveau moléculaire, afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement impliquées dans plusieurs voies de signalisation. Cette stratégie permettrait à la fois d'inhiber plusieurs réseaux de signalisation en même temps, maximisant l'efficacité de certains traitements. Prenons le cas de la MT1-MMP, cette métalloprotéinase membranaire est principalement documentée pour son rôle catalytique impliqué dans les processus invasifs (Sina et al, 2009). Toutefois, lors des dernières années, il a été démontré que la partie cytosolique de la MT1-MMP contribue, via une cascade signalétique, à plusieurs processus importants, dont l'inflammation (Currie et al, 2007) et l'autophagie (Ranasinghe et al, 2012). Le design d'inhibiteurs pharmacologiques performants contre cette protéine aurait donc un impact au niveau de trois processus cellulaires importants dans la progression tumorale.

1.3 Les métalloprotéinases matricielles

1.3.1 Définition et description

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des enzymes protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale dont rôle est de modifier et de dégrader la MEC. En effet, ces enzymes sont importantes pour de nombreux processus physiologiques dont le développement embryonnaire, la réparation de tissus et l'angiogenèse (Annabi et al, 2002). Elles contribuent toutefois à plusieurs pathologies lorsqu'elles sont surexprimées. En effet, leur surexpression est associée à différentes pathologies du SNC (Saikali et Singh, 2003; Sen et al, 2010) mais également à une panoplie de pathologies telles que l'inflammation chronique (Chopra et Roberts, 2001) et le cancer (Saikali et Singh, 2003). Les MMP ne sont pas uniquement

limitées à leur rôle classique de protéolyse. Au cours des dernières années, de nombreuses revues se sont attardées aux rôles très variés de signalisation cellulaire auxquelles elles participent. La portion intracellulaire de certaines MMP ancrées à la membrane plasmique serait impliquée dans des processus de mort cellulaire par apoptose (Markovic et al, 2011) et également dans l'autophagie (Alirezai et al, 2011).

1.3.2 Structure, classification et activation

La famille des MMP comporte 28 membres qui possèdent des domaines de structures conservés et ayant la propriété d'être zinc ou calcium dépendant. Il existe principalement deux types de MMP, soit les MMP solubles qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire sous forme zymogène, et les MMP membranaires (MT-MMP). Typiquement, les MMP solubles possèdent les régions suivantes du N-terminal au C-terminal : une région pro-peptide d'environ 80 acides aminés, un site catalytique d'environ 170 acides aminés, une région charnière de taille variable et une région hemopexine d'environ 200 acides aminés. Les MT-MMP possèdent les mêmes régions que la forme soluble, mais ont également un domaine transmembranaire et cytosolique de quelques acides aminés. La classification classique les divise en 6 sous-groupes, soit : les matrylisines, les collagénases, les gélatinases, les MMP membranaires, les stromélysines et autres MMP. Il existe également une classification moderne selon leur structure (Codogno et Meijer, 2005; Mathew et al, 2007) (Figure 1.9).

L'activation des MMP est catalysée par le clivage protéolytique de leurs pro-domaines par diverses protéases incluant principalement des furines, des plasmines et d'autres MMP. Le mécanisme d'action de l'activation est complexe et peut différer entre les MMP, toutefois une des caractéristiques communes du mécanisme de catalyse est l'élimination d'un résidu cystéine du pro-domaine, dans une séquence qui recouvre la pochette de zinc. Le clivage du pro-domaine va permettre à la MMP activée de dégrader divers substrats matriciels (Crotzer et Blum, 2010). Les MMP sont inactivées par divers inhibiteurs endogènes (Shen et Codogno, 2011). Les deux principaux étant les TIMPs (inhibiteurs tissulaires de métalloprotinases), qui comprennent quatre membres (TIMP-1 à -4) capables d'inhiber le site

catalytique des différentes MMP par liaison, et l' α -2 macroglobuline capable de trapper l'enzyme qui sera éliminé par endocytose.

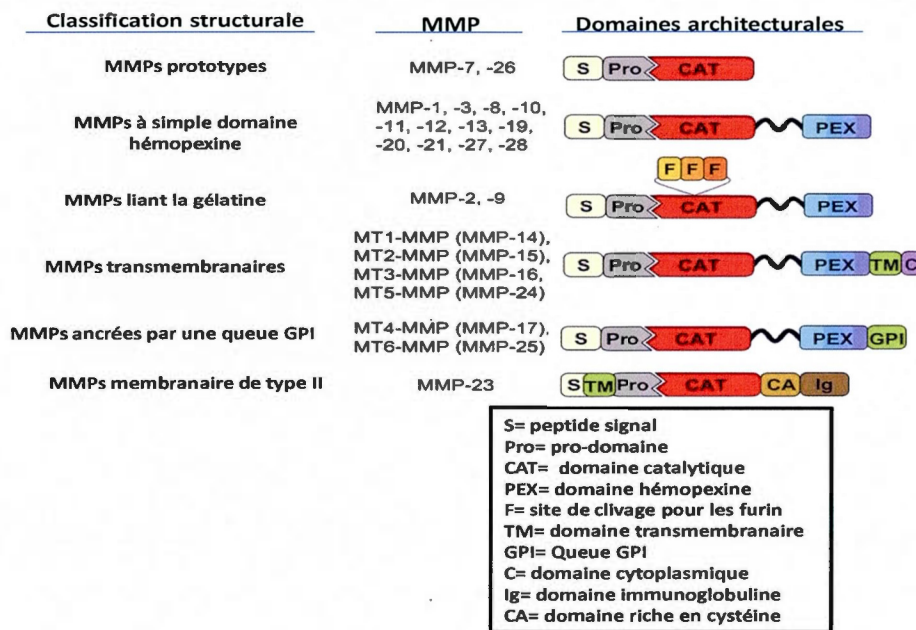


Figure 1.9 : Classification structurale moderne des MMP. Les MMPs peuvent être classées en six groupes : trois concernent des MMPs solubles et trois des MMPs membranaires. Leur structure minimale comprend un peptide signal (S), suivi d'un pro-domaine (pro) qui maintient l'enzyme latente et du domaine catalytique (CAT) qui contient le site de liaison au zinc. Des domaines additionnels s'ajoutent à cette structure : un domaine hémapexine C-terminal (PEX) pour la plupart des MMPs. Des sites de clivage par les enzymes de type furine (F). Les MMPs membranaires présentent un domaine transmembranaire (TM) suivi d'une extrémité cytoplasmique C-terminale (C) ou une queue glycoposphatidyl inositol (GPI). Le troisième type de MMPs membranaires (Type II) se

caractérise par un signal d'ancrage membranaire N-terminal (S), un domaine riche en cystéine (CA) et un domaine de type immunoglobuline (Ig).

[Adapté de Egeblad et Werb, 2002; Radisky et Radisky, 2010]

1.3.3 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est définie comme une structure complexe, formant un réseau architectural permettant de remplir les espaces vides entre les cellules, ce qui permet la création de tissus. Elle est principalement constituée de composés tels que: collagène, acide hyaluronique, protéoglycane, laminine, fibronectine, élastine et de composés organiques non-fibrillaires. La proportion de ces composantes varie en fonction du type de relations entre les cellules (Levine et Yuan, 2005). Biologiquement, la MEC est indispensable, car elle est le point d'ancrage des cellules. En effet, non seulement elle est un support d'adhérence pour les cellules, mais elle est également requise pour la migration cellulaire, ce qui implique qu'elle doit être continuellement remaniée lors de différents processus biologiques (Yang et al, 2011) comme la cicatrisation et l'angiogenèse via une dégradation par des MMPs (Kondo et al, 2005). La MEC est également le siège de communication entre les cellules nécessaire à l'homéostasie tissulaire (Su et al, 2013). Pour communiquer, les cellules peuvent sécréter diverses molécules messagères dans le milieu extracellulaire. La fixation de ces messagers sur des récepteurs spécifiques, exprimés sur la partie externe des cellules voisines, peut activer plusieurs cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans divers processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, la survie et la mort cellulaire.

1.3.4 La MT1-MMP

1.3.4.1 Structure et rôles biologiques

La MT1-MMP, appelée également MMP14, fait partie des MMP de type membranaire. Cette protéine d'environ 65kD possède différents domaines capables d'interagir avec plusieurs molécules, non seulement par son rôle protéolytique, mais également comme molécule de signalisation cellulaire (Figure 1.10a). Sa structure est composée de différents domaines ayant des fonctions spécifiques. Elle possède les deux domaines extracellulaires suivants, un pro-domaine et un domaine catalytique responsable de l'activation de plusieurs MMPs et également de la dégradation directe de diverses composantes de la MEC situées à proximité. Le domaine catalytique devient actif lors du clivage du pro-domaine. Une région charnière relie le site catalytique à un domaine hémapexine possédant des sites de liaisons pour diverses molécules. Enfin, la région hémapexine comporte un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique impliqué dans diverses voies de signalisation (Kuballa et al, 2012). La MT1-MMP joue un rôle important dans le remodelage de la MEC, un processus physiologique important, mais également à l'origine de diverses pathologies, notamment dans le cas du cancer. En effet, elle est surexprimée dans la plupart des cancers et joue un rôle central dans la migration et l'invasion, des processus qui sont à l'origine de l'agressivité des tumeurs et de la formation de métastases. La MT1-MMP contribue de façon directe et indirecte à la dégradation de la MEC. Parmi ses rôles protéolytiques classiques, elle peut dégrader directement diverses composantes locales de la MEC comme du collagène de type 1 et 3, de la fibronectine, de la laminine et de la fibrine. Elle est également un élément indispensable au mécanisme d'activation de la proMMP-2, une MMP soluble clé pour l'angiogenèse (Kim et al, 2011). Au cours des dernières années, plusieurs études se sont concentrées sur l'importance de son domaine cytoplasmique dans des processus de signalisation cellulaire très variés. En effet, elle contribue à la survie tumorale, régule le transport de glucose (Mizushima, 2007), l'apoptose (Chen et Klionsky, 2011) et l'autophagie (Pratt et al, 2012).

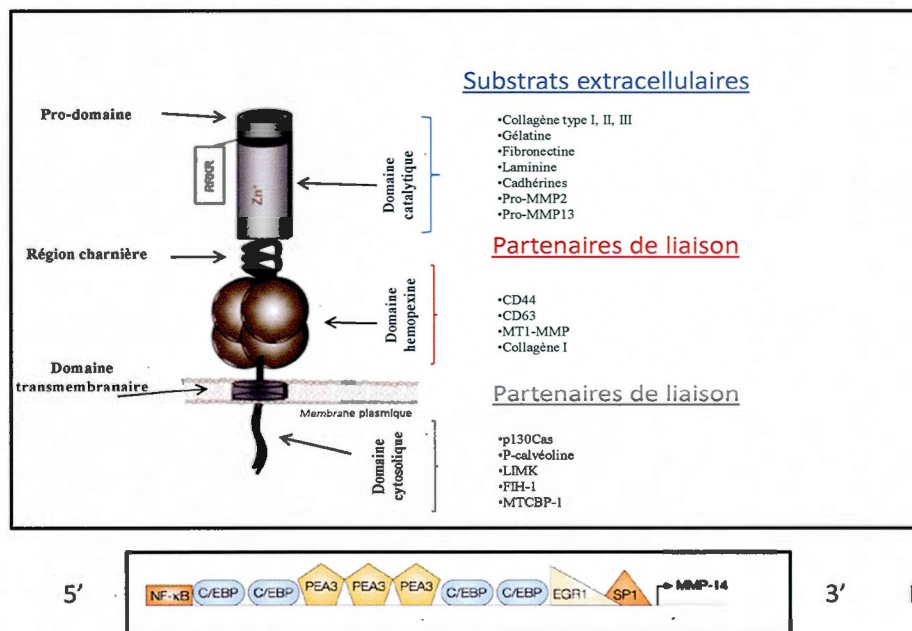


Figure 1.10 : Structure de la MT1-MMP et éléments de régulation transcriptionnelle.

A) La MT1-MMP possède différents domaines avec des rôles spécifiques. La région catalytique est impliquée dans la dégradation de divers substrats extracellulaires, la région hémopexine possède des domaines de liaison pour diverses molécules dont des MT1-MMP permettant l'oligomérisation. Le domaine cytosolique est impliqué dans plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. B) Domaine de liaison sur la séquence promotrice du gène MT1-MMP partant du 5 '(gauche) vers le 3 '(droite). Plusieurs facteurs transcriptionnels sont capables de moduler son expression.

[Adapté de Koziol et al, 2012; Overall et Lopez-Otin, 2002]

1.3.4.2 Mécanisme d'activation de la proMMP2

La MMP2 est une métalloprotéinase matricielle soluble de 72 kDa qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme inactive. Cette gélatinase, très impliquée dans l'invasion tumorale, a comme substrat le collagène de type 4. Son activation requiert la formation d'un complexe tri-moléculaire avec la MT1-MMP et la TIMP-2, suivi d'une protéolyse (Figure 1.11). En effet, lorsque la concentration de TIMP-2 est basse la MT1-MMP va agir dans un premier temps comme un récepteur à la surface membranaire, pour permettre la liaison de TIMP-2 sur la partie N-terminale de son site actif. La formation de ce complexe binaire va servir de récepteur pour la proMMP-2 qui va ensuite se lier via son domaine C-terminal au domaine C-terminal de TIMP-2 et maintenant former un complexe tri-moléculaire. Une deuxième molécule de MT1-MMP active à proximité va cliver le pro-domaine de la proMMP-2 pour générer une espèce intermédiaire. Cet intermédiaire va générer une MMP-2 active, via un processus d'autocatalyse. Dans le cas d'une haute concentration en TIMP-2, l'activation de la proMMP-2 sera inhibée car le site catalytique de la deuxième molécule de MT1-MMP, requis pour le clivage de son pro-domaine, sera inhibé via un excès de TIMP-2 (Chen et Klionsky, 2011).

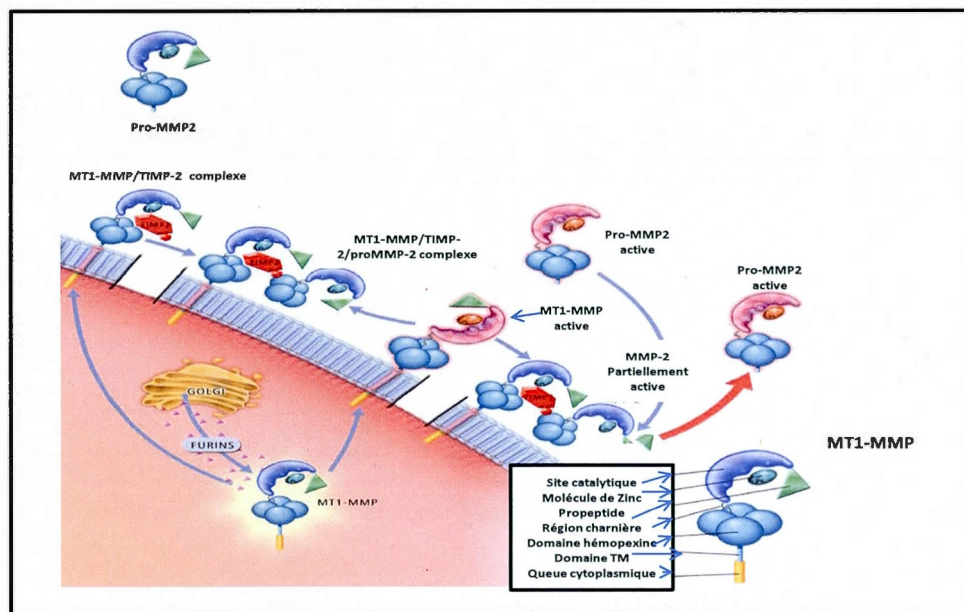


Figure 1.11 : Mécanisme d'activation de la proMMP-2. La proMMP-2 est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme inactive. Une première MT1-MMP située à la membrane plasmique va permettre la liaison d'une TIMP-2 et former un complexe bimoléculaire permettant la liaison de la proMMP-2 pour former un complexe trimoléculaire. Une seconde MT1-MMP membranaire active va ensuite cliver le pro-domaine de la proMMP-2 permettant son activation.

[Adapté Dollery et Libby, 2006]

1.3.4.3 Régulation à la surface membranaire

MT1-MMP est régulée par de nombreux mécanismes qui vont contrôler le niveau d'expression de la forme active à la surface membranaire. La MT1-MMP est d'abord

synthétisée sous forme zymogène, elle est activée par clivage de son pro-domaine par des furines. Une fois activée, elle va être ciblée à la membrane par trafic vésiculaire (Levine et Yuan, 2005). Comme toutes les autres MMP, la forme active peut être inactivée par des inhibiteurs endogènes de la famille des TIMPs (TIMP-2,-3,-4) qui vont se lier à son site catalytique (Wu et al, 2010). Il faut toutefois mentionner que le rôle de TIMP2 est plus complexe, car il intervient également dans l'activation de la pro-MMP2. L'activité de la MT1-MMP à la membrane peut aussi être régulée par trois mécanismes importants, soit: l'internalisation, la formation d'oligomères et par processus d'autoclivage (Figure 1.12).

L'internalisation est le principal mécanisme qui permet de réguler les niveaux de la forme active de MT1-MMP à la surface membranaire. En effet, cette forme d'endocytose permet de diriger les protéines vers la dégradation lysosomiale ou le recyclage à la membrane plasmique. Le processus d'endocytose est médié par la queue cytoplasmique de la MT1-MMP qui va induire des processus d'internalisation, via des puits de clathrine pour une réponse rapide, ou via l'action de la cavéoline (Kimmelman, 2011). Le rôle principal de la formation d'oligomères de MT1-MMP a d'abord été documenté comme étant essentiel pour faciliter l'activation de la proMMP-2 à la surface membranaire (Ding et Yin, 2012). Toutefois, des études ont suggéré que la formation de complexes oligomériques, via la région hémapexine de la protéine, bloquerait certains sites qui empêcheraient son activité catalytique (Gomori et al, 2012). Les mécanismes et le rôle des oligomères demeurent peu documentés et ne sont pas encore clairs. L'autocatalyse de MT1-MMP génère un fragment de 44 kDa et un fragment soluble d'environ 18 kDa, contenant le site catalytique inactivé. L'autoprotéolyse de MT1-MMP est régulée par diverses molécules de son microenvironnement, comme des facteurs de croissance, des niveaux peu élevés de TIMPs et également par plusieurs protéines de la MEC (Lrhezzioui et al, 2007). Il est également possible d'induire artificiellement ce processus par des molécules comme la concanavaleine-A et certains inhibiteurs de la dégradation lysosomiale (Takino et al, 2003).

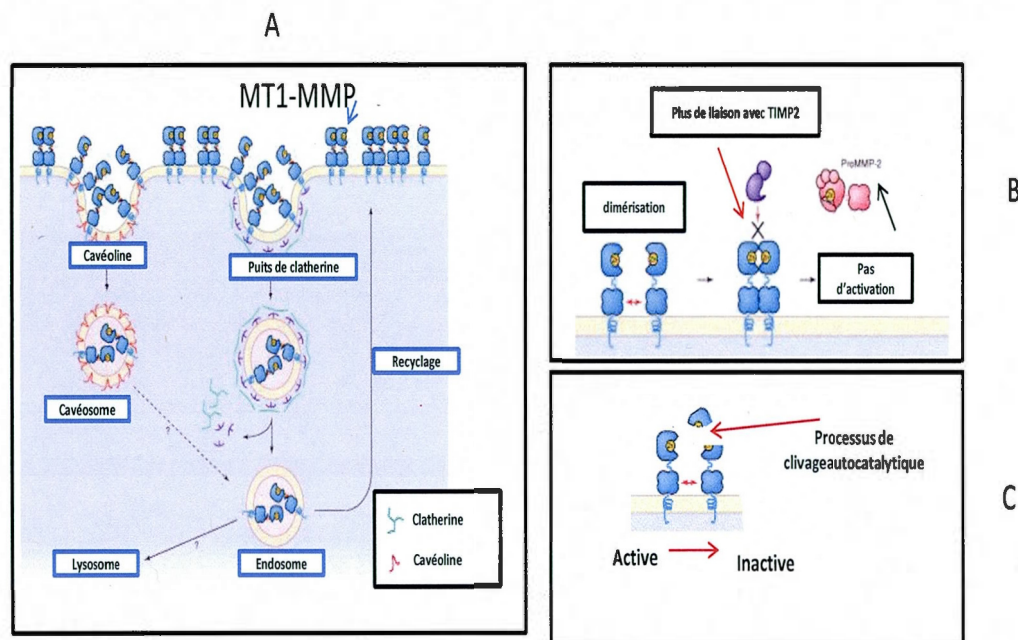


Figure 1.12 : Résumé des 3 mécanismes de régulation de la MT1-MMP active à la membrane plasmique. A) La MT1-MMP peut être recyclée ou dégradée par internalisation via des cavéolines ou des puits de clatherines. B) La forme active de la MT1-MMP membranaire peut également être inactivée par une oligomérisation bloquant l'accès à son site catalytique. C) La MT1-MMP peut aussi s'inactiver par autoclivage.

[Adapté de Itoh et Seiki, 2004; Lehti et al, 1998]

1.3.4.4 Régulation transcriptionnelle

Classiquement, il a été rapporté que les facteurs de croissance et certaines cytokines sont à la base de la modulation et de la régulation de l'expression génique de la MT1-MMP (Itoh et Seiki, 2004). Par ailleurs, certains facteurs de croissance tel l'EGF et certaines cytokines telles les CSF sont capables de moduler son expression (Hanahan et Weinberg, 2011). La séquence promotrice du gène de la MT1-MMP possède plusieurs sites de liaison pour différents facteurs transcriptionnels comme EGR1, SP1, AP-4 et NF κ B (Figure 1.10b) (Overall et Lopez, 2002). Il a cependant été rapporté que le facteur EGR1 serait le plus important. En effet, l'augmentation de la liaison de l'EGR1 sur le promoteur de la MT1-MMP impliquerait un déplacement hors site de la protéine SP1, ce qui initierait l'induction de la transcription (Itoh et Seiki, 2004). Plusieurs agents exogènes sont également capables d'induire l'expression génique de la MT1-MMP. L'utilisation d'inducteurs classiques tels que la concanavale-A, permet d'induire artificiellement l'expression de la MT1-MMP (Sina et al, 2010). Récemment, il a été démontré que la protéine NANOS1, surexprimée dans le cancer du poumon, participerait à la régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP. En effet, l'utilisation d'ARN interférent contre cette protéine, a permis de démontrer son rôle dans l'induction de l'expression génique de la MT1-MMP (Bonnomet et al, 2008).

1.3.4.5 Implication dans l'autophagie

Les études des dernières années ont fourni des évidences de la participation de MT1-MMP dans l'autophagie. L'autophagie est un processus catabolique de dégradation du matériel cellulaire, très important pour la survie des cellules cancéreuses soumises à divers traitements thérapeutiques. En effet, plusieurs phénomènes de résistance sont associés à la capacité autophagique des cellules cancéreuses permettant leur autoréparation. L'autophagie est également une source d'énergie pour les tumeurs ayant des besoins accrus en nutriments, mais peut également devenir un processus de mort cellulaire lors d'un excès de stimuli autophagique (Lorin et al, 2008). La balance entre la survie et la mort par autophagie est complexe et pas encore bien élucidée. Une étude récente a démontré un lien étroit entre l'induction du phénomène autophagique et la présence requise de la MT1-MMP. En effet,

L'utilisation d'ARN interférent contre la MT1-MMP a permis d'observer d'importantes diminutions au niveau de l'expression de biomarqueurs pro-autophagiques (Pratt et al, 2012). Plus précisément, la partie cytosolique de la MT1-MMP serait impliquée dans une cascade de signaux régulant ces phénomènes (Pratt et al, 2012). Une meilleure compréhension de son rôle dans l'autophagie pourrait permettre à la fois d'inhiber des phénomènes hautement invasifs et des phénomènes de résistance tumorale.

1.4 Les inhibiteurs pharmacologiques des MMPs

1.4.1 Sélectivité et spécificité

La prévention et le traitement des métastases demeurent des défis importants dans l'avancée des thérapies contre le cancer. Depuis les années 1990, les compagnies pharmaceutiques sont à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans l'invasion tumorale. La découverte des MMP a contribué au développement d'agents pharmacologiques potentiellement efficaces pour atténuer le caractère hautement invasif de certaines tumeurs. Depuis ce temps, plus de cinquantes inhibiteurs ont été développés et testés cliniquement. La plupart des inhibiteurs testés en présence de peptides synthétiques imitant le site catalytique de divers MMP, donnaient des résultats prometteurs (Zucker et Cao, 2009). Lors de la phase clinique, les résultats espérés étaient pourtant décevants. Plusieurs problèmes étaient à l'origine de cette inefficacité (Zucker et Cao, 2009) : 1) aucune de ces drogues n'était très sélective pour des MMP spécifiques. 2) la tolérance à la drogue n'était pas prise en compte. 3) les dosages administrés étaient basés sur des études cinétiques obtenues sur des sujets en santé et n'étaient pas représentatifs d'une administration chronique à des sujets ayant le cancer. 4) Certaines MMP comme la MMP-8 et la MMP-12 possèdent des propriétés anti-tumorales, l'inhibition par manque de sélectivité de ces MMP causait problème. Dans le développement moderne d'inhibiteurs de MMP, le plus grand défi est d'obtenir des effets à spectre très spécifique dans des modèles plus représentatifs.

1.4.2 Les inhibiteurs de la MMP-2 et de la MT1-MMP

Il existe à l'heure actuelle toute une panoplie d'inhibiteurs de MMP, la plupart d'entre eux possèdent divers groupements capables de chélater l'atome de zinc du site catalytique des MMP. Dans le paragraphe suivant, cinq grandes catégories d'inhibiteurs de MMP seront présentées (Fisher et Mobashery, 2006). Les premiers inhibiteurs développés, considérés comme les pionniers dans cette innovation, sont les hydroxamates. Cette classe d'inhibiteur est cependant très peu sélective et cause des effets secondaires par inhibition de protéases de la famille des ADAMs impliquées dans de nombreux processus physiologiques normaux (Seals et Courtneidge, 2003). Une seconde génération d'hydroxamates a été développée avec une efficacité améliorée. En effet, l'utilisation de différents groupes de liaison au zinc a amélioré la sélectivité de ce type d'inhibiteurs. Dans les nouvelles générations, des inhibiteurs avec des groupements thiols ont été développés avec de grandes affinités de leur groupement hydroxyle pour le zinc (IC_{50} de l'ordre du nanomolaire). Une autre classe d'inhibiteurs à base de groupement pyrimidine est très intéressante notamment par leur sélectivité pour les MT-MMP. Il existe également des inhibiteurs contenant des phosphores présentant une structure tétraédral qui favorise la liaison au site catalytique. En effet, la création de ce type d'inhibiteur a révolutionné le design d'inhibiteurs de MMP subséquents (Seals et Courtneidge, 2003).

L'intérêt de mes recherches étant principalement centré sur l'axe MT1-MMP/MMP-2, une revue de quelques inhibiteurs donnant de bons résultats dans des modèles cellulaires cancéreux sera présentée dans ce paragraphe (Figure 1.13a). L'ARP101, un nouvel inhibiteur comportant dans sa structure des groupements sulfamides, a montré des propriétés d'inhibition très efficace contre la MMP-2 dans des cellules humaines de fibrosarcomes HT1080 (Rossello et al, 2004). L'actinonine est un autre inhibiteur aux propriétés intéressantes. Il a été démontré dans des cellules de glioblastomes qu'elle possède la capacité d'inhiber l'activation de la proMMP-2 en ciblant le site catalytique de la MT1-MMP (Sina, Lord-Dufour et Annabi, 2009). L'ilomastat est un inhibiteur catalytique de la MT1-MMP, son effet inhibiteur a été démontré dans des cellules stromales de la moelle osseuse (Currie et al, 2007). Plus récemment, il a été démontré que l'agent pharmacologique SB3CT est capable d'inhiber sélectivement plusieurs MMP selon la dose utilisée (Ranasinghe et al, 2012). Il possède en effet des constantes d'inhibition différentes allant du nanomolaire au

millimolaire, lui permettant de cibler différentes MMP. Il existe également des inhibiteurs dérivant de produits naturels qui sont très efficaces. Parmi cette catégorie, une catéchine du thé vert, l'EGCG (épigallocatechine gallate) permet une inhibition catalytique, mais également transcriptionnelle de la MMP-2 (Annabi et al, 2002). Elle agit aussi sur la MMP-9 (Sen et al, 2010) qui est très active dans les processus d'invasion tumoraux.

1.4.3 Les tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques de la famille des cyclines utilisées dans de nombreuses infections telles que la pneumonie, la chlamydia et la maladie de Lyme (Saikali et Singh, 2003). Leurs structures (Figure 1.13b) sont composées de quatre cycles hydrocarbonés où des groupements cétones, hydroxyles et azotés sont accrochés (Chopra et Roberts, 2001). Il a été rapporté que la doxycycline et la minocycline possèdent des propriétés anti-tumorales par leur capacité d'inhiber certaines MMP (Yao et al, 2007). Dans le premier mécanisme proposé, les tétracyclines auraient la propriété de se lier à l'atome de zinc ou de calcium du site actif de la MMP, ce qui bloquerait son activité catalytique. Elle aurait également la propriété d'inhiber l'activation oxydative des MMP sous forme latente et également un effet d'inhibition de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'induction transcriptionnelle de diverses MMP (Saikali et Singh, 2003). Plus intéressant encore, la minocycline contribuerait non seulement à diminuer l'expansion des gliomes en inhibant la transcription de MT1-MMP (Markovic et al, 2011), mais posséderait également des propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Alirezai et al, 2011). Les mécanismes d'action des tétracyclines agissant sur l'expression génique des différentes MMP demeurent toutefois non élucidés.

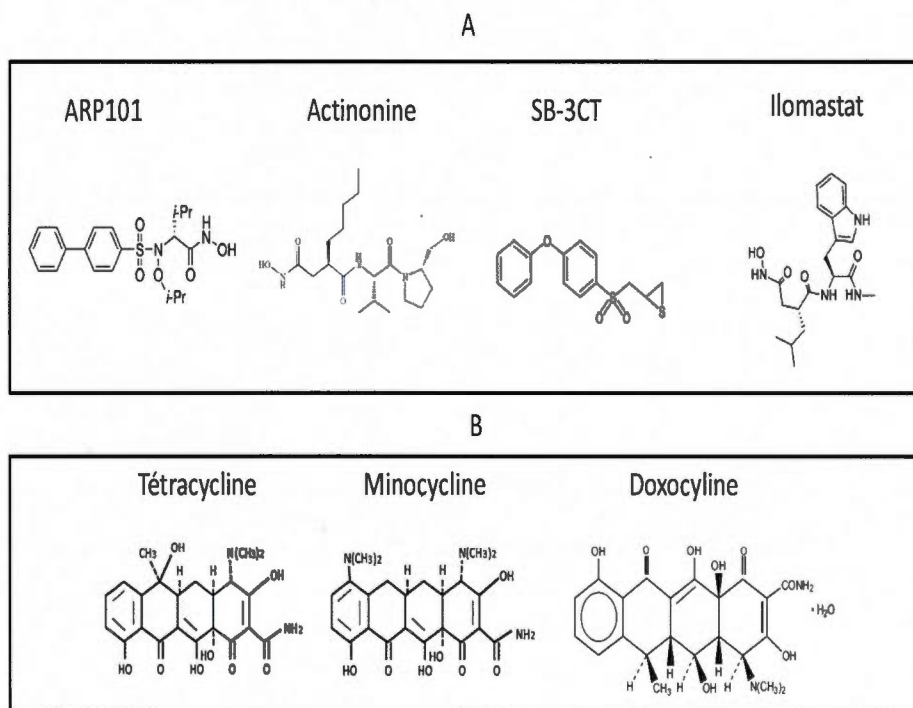


Figure 1.13 : Structure de différents inhibiteurs de MMP. A) Structure de 4 inhibiteurs de la MMP-2 B) Structure générale des tétracyclines et de ses dérivés minocycline et doxocycline.

[Adapté de Sigma-Aldrich]

1.5 L'autophagie

1.5.1 Balance homéostatique : double rôle

L'autophagie est un processus catabolique de dégradation lysosomiale à l'intérieur d'une cellule qui est activé en réponse à divers stress. En effet, il s'agit d'un mécanisme physiologique adaptatif où la cellule va dégrader une partie de son contenu pour maintenir son homéostasie (Figure 1.14) (Mathew et al, 2007). L'autophagie peut être à la fois un mécanisme de survie et de mort cellulaire, ce qui en fait un sujet très controversé dans la communauté scientifique (Codogno et Meijer, 2005). Les cellules sont continuellement soumises à différents stress comme par exemple des carences nutritionnelles et des protéines et organelles endommagées par des agents exogènes. Dans le cas d'une carence en nutriments, la cellule va s'adapter métaboliquement, en dégradant une partie de son contenu pour produire l'énergie manquante. Parmi ses autres fonctions physiologiques, l'autophagie permet le remplacement continu de protéines et organelles non-fonctionnelles, elle joue également un rôle dans l'élimination de pathogènes intracellulaires et dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, elle va dégrader des protéines en peptides qui seront ensuite présentés au complexe majeur d'histocompatibilité (Crotzer et Blum, 2010). L'autophagie peut également être une forme de mort cellulaire indépendante de l'apoptose. Il existe une grande confusion à l'heure actuelle à savoir si c'est l'autophagie qui accompagne la mort cellulaire ou bien la mort qui survient par autophagie. Le mécanisme à l'origine de ce type de mort demeure très ambigu (Levine et Yuan, 2005; Shen et Codogno, 2011).

1.5.2 Rôles de l'autophagie dans le cancer et intérêt thérapeutique

L'autophagie représente un axe de recherche d'intérêt dans l'innovation de traitements thérapeutiques contre le cancer. En effet, les résultats actuels montrent une relation étroite entre l'autophagie et la progression tumorale. De façon paradoxale, l'autophagie jouerait un double rôle dans la cancérogenèse, contribuant à des propriétés pro-tumorales et à la fois anti-tumorales. De façon générale, l'autophagie joue un rôle pro-tumoral de plusieurs façons (Yang et al, 2011); principalement, elle va permettre aux cellules tumorales exposées à des

situations de stress métabolique de combler leurs apports en nutriments nécessaires à leur croissance. En effet, les tumeurs faiblement vascularisées en hypoxie vont utiliser l'autophagie pour générer de l'ATP et maintenir leurs biosynthèses cellulaires (Toshima et al, 2013). Hypothétiquement, certaines recherches suggèrent également que l'autophagie pourrait permettre aux cellules cancéreuses de proliférer en absence de facteurs de croissance leur permettant ainsi de s'infiltrer dans des tissus normaux et de former des métastases. L'autophagie joue également un rôle clé dans les processus de chimiorésistance tumorale. En effet, les cellules cancéreuses soumises à différents traitements comme la chimiothérapie et la radiothérapie, auraient la possibilité de réparer certains dommages cellulaires causés par les agents thérapeutiques, ce qui leur permettrait de survivre. La cellule résistante tomberait dans un état de dormance résiduelle, ce qui contribuerait à la récurrence de la tumeur (Quesnel, 2013).

Plusieurs auteurs suggèrent que les propriétés anti-tumorales de l'autophagie seraient associées à leur contribution dans divers phénomènes tels qu'une diminution de l'instabilité chromosomique, des propriétés anti-prolifératives, anti-inflammatoires et également un rôle de suppresseur de tumeur (Kondo et al, 2005). En effet, un des mécanismes proposés de suppression tumorale est associé à l'induction d'une mort par autophagie. Le mécanisme demeure toutefois très complexe et incompris (Su et al, 2013). L'activité anti-tumorale de l'autophagie serait également liée à sa collaboration avec certaines cellules immunitaires. En effet, dans des conditions hypoxiques l'autophagie serait capable d'activer certains neutrophiles capables de détruire des cellules cancéreuses (Kuballa et al, 2012).

La complexité des relations associant l'autophagie au cancer, tant pour ces implications pro- que anti-tumorales, nécessite une meilleure compréhension des mécanismes en jeux. Plusieurs traitements expérimentaux ou cliniques contre le cancer ciblent désormais des processus autophagiques (Kim et al, 2011; Mizushima, 2007). Le nombre élevé de cibles moléculaires impliquées dans l'autophagie procure un avantage au niveau de la versatilité dans le développement d'inhibiteurs efficaces. Le ciblage pharmacologique de l'autophagie pourrait à la fois bloquer la croissance tumorale à des stades plus avancés en étant administrés en combinaison avec un traitement classique afin de diminuer la

chémiorésistance. Il est également intéressant d'exploiter ce type de mort cellulaire, sachant que les mécanismes apoptotiques sont déficients dans les cellules cancéreuses. Une meilleure compréhension moléculaire de ces phénomènes favoriserait une avancée dans le domaine.

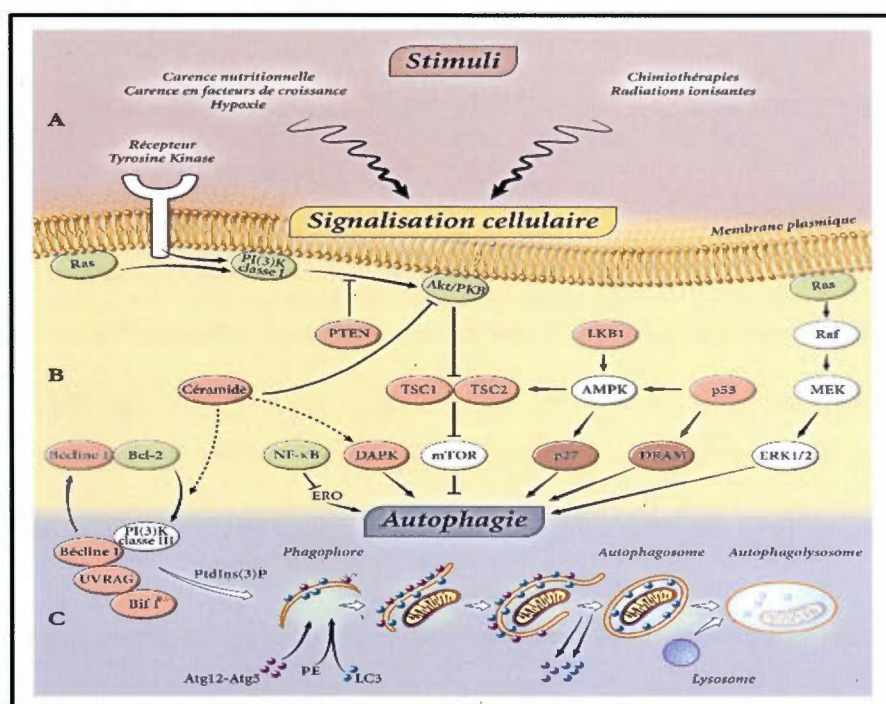


Figure 1.14 : Mécanisme simplifié de la formation de vacuoles acides autophagiques.

Au niveau cellulaire, plusieurs stimuli de stress (carence nutritionnelle, hypoxie, dommage à des organelles par des agents exogènes) vont être l'élément déclencheur du processus autophagique. La molécule clé qui agit comme un interrupteur «on/off» régulant ce processus est mTOR. En effet, cette molécule inhibe l'autophagie en temps normal. Après les stimuli initiaux, plusieurs cascades de signalisation vont converger vers cette molécule pour l'inactiver, ce qui va causer une levée d'inhibition et permettre le déclenchement de l'autophagie. Une des premières étapes sera la biosynthèse d'une membrane appelée

phagophore permettant d'entourer le matériel à dégrader. Cette biosynthèse sera assurée par les protéines ATG (*Autophagy-related genes*). Par la suite, le phagophore va subir une élongation complète jusqu'à entourer de façon hermétique le matériel à dégrader formant un autophagosome. La dernière étape sera caractérisée par la fusion entre l'autophagosome et un lysosome qui va permettre la digestion du contenu via l'acidité.

[Adapté de Lorin et al, 2008]

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Les carcinomes hépatocellulaires sont des tumeurs malignes du foie qui représentent un des cancers les plus mortels (Khare et al, 2013). Au cours des deux dernières décennies, une augmentation dramatique de 80% du taux d'incidence de ce cancer a été observée, notamment aux États-Unis (Rahman et al, 2013). L'augmentation du taux d'incidence est corrélée à l'augmentation de diverses pathologies telles que l'obésité, le diabète, l'hypertension et également à des problèmes préexistants de cirrhose du foie et d'hépatite (Rahman et al, 2013). Il existe une étroite corrélation entre des niveaux élevés d'inflammation et le cancer du foie. En effet, environ 63% des carcinomes hépatocellulaires sont causés par des lésions inflammatoires chroniques (Ugiagbe et Udoh, 2013; Wieser et al, 2013), indiquant qu'il s'agit principalement d'un cancer causé par des pathologies préexistantes du foie. Une des principales raisons du faible taux de survie est en l'occurrence le diagnostic tardif de la maladie. En effet, lors du diagnostic de cancer, la présence de métastases est souvent notable. Également, les phénomènes de résistance au traitement sont un problème majeur dans ce type de cancer (Peng et al, 2013). Un des processus cellulaires contribuant au caractère malin est l'autophagie qui contribue à la fois à la chimiorésistance, mais également à la formation de métastases (Guo et al, 2013). L'inhibition efficace des processus inflammatoires et autophagiques pourrait donc non seulement contribuer à diminuer le phénotype agressif de ce type de tumeur, mais également diminuer les phénomènes de chimiorésistance permettant une meilleure efficacité des traitements classiques.

La MT1-MMP est une cible de choix dans le développement d'agents pharmacologiques anticancéreux. En effet, elle contribue directement au phénotype invasif des tumeurs en activant diverses MMPs solubles de la MEC, via son domaine catalytique, permettant une dégradation localisée de la MEC nécessaire à l'invasion tumorale (Kuballa et al, 2012).

Toutefois, des études récentes montrent son implication, via son domaine cytosolique, dans plusieurs voies de signalisation régulant l'inflammation (Sina et al, 2010) et l'autophagie (Pratt et al, 2012). Les mécanismes moléculaires liant la MT1-MMP à l'autophagie demeurent peu documentés. Une meilleure compréhension de l'implication de la MT1-MMP dans l'autophagie au niveau moléculaire, ainsi que de ses modulateurs transcriptionnels, permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.2 Hypothèse de travail

Les propriétés non-antibiotiques de la minocycline, un dérivé de la tétracycline connu pour diminuer l'expression génique de la MT1-MMP dans des cellules de glioblastômes, pourraient contribuer à inhiber les voies de signalisation dépendantes de la MT1-MMP. Nous émettons donc la première hypothèse suivante :

Hypothèse 1 : La minocycline pourrait inhiber l'inflammation et l'autophagie en diminuant l'expression génique de la MT1-MMP.

Sachant que la molécule NANOS1 est impliquée dans la modulation transcriptionnelle de la MT1-MMP, nous émettons la deuxième hypothèse suivante :

Hypothèse 2 : Le mécanisme d'action de la minocycline associé à la diminution transcriptionnelle de la MT1-MMP pourrait dépendre d'une inhibition de l'expression de NANOS1.

Enfin, un lien étroit entre la MT1-MMP et le facteur activateur de transcription STAT3 documenté dans la littérature scientifique, impliqué également dans l'angiogenèse, nous conduit à émettre la troisième hypothèse :

Hypothèse 3 : La minocycline pourrait inhiber la voie JAK/ STAT3 et également diminuer l'expression transcriptionnelle de la MT1-MMP.

2.3 Objectifs de recherche

Dans un premier temps, nous souhaitons étudier l'impact de la minocycline sur des processus inflammatoires et autophagiques en utilisant de la concanavaleine-A (ConA), une lectine reconnue pour induire l'expression des biomarqueurs MT1-MMP, COX-2 et BNIP3. La suractivation du système cellulaire par la ConA permet non seulement d'induire des phénotypes inflammatoires et autophagiques, mais également de mimer un stress cellulaire et moléculaire causé par un agent de chimiothérapie.

Nous souhaitons évaluer dans un deuxième temps, l'importance de la MT1-MMP dans les voies de signalisations inflammatoires et autophagiques en analysant de l'expression génique et protéique des biomarqueurs COX-2 et BNIP3, ainsi que par l'analyse de la formation de vacuoles acides autophagiques.

Finalement, nous souhaitons déterminer l'impact de la minocycline sur la régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP. L'impact de la minocycline sur l'expression transcriptionnelle de NANOS1 et STAT3, ainsi que les niveaux de phosphorylations de STAT3, sera également étudié dans le but de déterminer son mécanisme d'action sur la MT1-MMP.

CHAPITRE III

TETRACYCLINE DERIVATIVE MINOCYCLINE INHIBITS AUTOPHAGY AND INFLAMMATION IN CONCAVALIN-A-ACTIVATED HUMAN HEPATOMA CELLS

Article publié dans la revue scientifique *Gene Regulation and System Biology*

Contributions des co-auteurs :

Desjarlais : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Pratt : Expérimentation, analyse des résultats, rédaction du manuscrit.

Lounis : Expérimentation, analyse des résultats.

Mounier : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit et conception du projet.

Haidara : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit et conception du projet.

Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.

**The tetracycline derivative minocycline inhibits autophagy and inflammation in
Concanavalin-A-activated human hepatoma cells**

Michel Desjarlais¹, Jonathan Pratt¹, Amine Lounis², Catherine Mounier², Khadidja Haidara¹
and Borhane Annabi¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, and ²Département des
Sciences Biologiques, Centre de recherche BIOMED, Université du Québec à Montréal,
Quebec, Canada

Correspondence should be directed to :

Borhane Annabi, PhD, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514)
987-3000 ext 7610; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Hepatocellular carcinoma cells, concanavalin-A, autophagy, inflammation,
minocycline, antibiotic, cancer

Page heading : Minocycline inhibits Concanavalin-A-mediated autophagy

Abbreviations : BNIP3, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3; ConA,
concanavalin-A; COX, cyclooxygenase; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-to-
mesenchymal transition; ER, endoplasmic reticulum; MMP, matrix metalloproteinase; GFP-
LC3, green fluorescent microtubule-associated protein 1 light chain 3; MT1-MMP,
membrane type-1 MMP; STAT, signal transducers and activators of transcription; TLR,
Toll-like receptors

SUMMARY STATEMENT

This study shows that, besides its classical antibiotic properties, minocycline can inhibit autophagy and inflammation biomarkers expression in cancer cells. It also shows that minocycline affects NANOS1 a regulator of MT1-MMP involved in autophagy signalling.

ABSTRACT

Inhibition of soluble matrix metalloproteinase (MMP) activity is among the non-antibiotic cellular effects exerted by the anti-inflammatory tetracycline derivative minocycline. The impact of minocycline on the signal transducing functions of membrane bound MMPs is however unknown. We assessed minocycline in a Concanavalin-A (ConA)-activated human HepG2 hepatoma cell model, a condition known to increase the expression of membrane type (MT)1-MMP and to trigger inflammatory and autophagy processes. We found that minocycline inhibited ConA-induced formation of autophagic acidic vacuoles, GFP-LC3 puncta formation, gene and protein expression of autophagy biomarker BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), invasion biomarker MT1-MMP, and inflammation biomarker cyclooxygenase (COX)-2. Gene silencing of MT1-MMP abrogated ConA-induced formation of autophagic acidic vacuoles and ConA-induced expressions of BNIP3 and COX-2. Minocycline was also shown to inhibit ConA-induced STAT3 phosphorylation as well as gene expression of NANOS1, a biomarker believed to colocalize with MT1-MMP and the specific silencing of which further inhibited ConA-induced STAT3 phosphorylation. Collectively, our data demonstrate that part of minocycline's effects on autophagy could be exerted through the inhibition of MT1-MMP signaling functions, which contribute to the autophagy and inflammatory phenotype of ConA-activated HepG2 cells.

INTRODUCTION

Cancer cells evolve within a stressful pathological setting characterized by lack of nutrients and an inadequate oxygen supply, combined with a proinflammatory microenvironment (Swampillai et al, 2012). Such conditions, in turn, lead to further types of stresses including oxidative stress, which collectively can lead to cell death through autophagy, a homeostatic mechanism that regulates the turnover of long-lived or damaged proteins and organelles (Rosenfeldt et al, 2011). Autophagy is a highly adaptative metabolic process that plays an important role in stressful conditions regulating cancer cells growth and proliferation (Grivennikov et al, 2010; Maeda et Omata, 2008; Sun et al, 2013), and which adds up to the resisting cell death molecular signature of cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). Interestingly, hepatomas are characterized by a chronic pro-inflammatory environment which contributes to tumor progression. In fact, more than 90% of hepatocellular carcinomas develop within the context of chronic liver damage and inflammation (Nakawaga et Maeda, 2012).

The molecular interplay between inflammatory and autophagic cues in hepatomas are currently poorly understood (Cui et al, 2013; Rubinstein et Kimchi, 2012). In fact, autophagy is strongly present in many types of cancer cells and this adaptative activity is a major factor related to tumor progression (Sun et al, 2013). Moreover, given that autophagy has recently attracted attention with respect to programmed cell death (Rubinstein et Kimchi, 2012), it is reasonable to hypothesize that any approach that would interfere with autophagy in cancer cells could therefore lead to increased cell death and to reduced resistance of cells to a given therapeutic agent.

The tetracycline-derived antibiotic minocycline was recently reported to inhibit inflammatory (Levine et Kroemer, 2008; Panga et al, 2012) and invasive processes (Dunston et al, 2011; van den Bogert et al, 1985), which contribute to tumor progression. While current evidence already validates minocycline as a potential therapeutic drug for multiple neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease and Huntington's disease (Ataie-Kachoie et al, 2013), its pharmacologic effects on hepatoma cells and on autophagy

processes remain unknown. Furthermore, although inhibition of glioma growth by minocycline was recently reported to be mediated through endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis and autophagic cell death (Kim et al, 2009), the precise mechanism of action involved remains unknown.

Membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) belongs to the MMP family of enzymes which play an important role in extracellular matrix (ECM) degradation, allowing angiogenesis and tumor invasion (Gingras et al, 2010; Gialeli et al, 2011). It has been recently demonstrated that MT1-MMP further triggered inflammatory (Kozioł et al, 2012; Akla et al, 2012; Sina et al, 2010), autophagic (Pratt et al, 2012), and ER stress signaling (Proulx-Bonneau et al, 2011). Accordingly, a role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of ER stress was reported in U87 glioblastoma cells (Markovic et al, 2011). In fact, MT1-MMP was shown to be involved in Concanavalin-A (ConA)-induced autophagy as reflected by increased expression of biomarkers such as BNIP3, and to elicit an inflammatory response through MT1-MMP-mediated increases in COX-2 (Sina et al, 2010; Pratt et al, 2012). Given that ConA highly induces MT1-MMP and that the clinically approved antibiotic minocycline showed promising properties for adjuvant therapy against malignant gliomas, in part through inhibiting microglial MT1-MMP expression (Markovic et al, 2011), we sought to investigate further the impact of minocycline on MT1-MMP-mediated inflammation and autophagy in a ConA-activated HepG2 hepatoma cell model.

MATERIALS AND METHODS

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS), concanavalin-A (ConA), minocycline, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The anti-STAT3 (79D7) and anti-phospho-STAT3 (Tyr 705) polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The polyclonal antibodies against the MT1-MMP catalytic domain and against BNIP3 were from Chemicon (Temecula, CA). Monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody was from Advanced Immunochemical (Long Beach, CA). The polyclonal antibody against COX-2 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Cell cultures : Human hepatocellular HepG2 carcinoma cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; HB-8065, Manassas, VA). Serum starvation was performed by culturing the cells in Eagle's minimal essential medium (EMEM; GibcoBRL) with 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, and from which the 10% inactivated fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) was omitted.

Detection of autophagic acidic vesicular organelles : HepG2 cells were serum-starved following the different conditions of treatment with ConA or minocycline, or following siRNA transfections. Acridine Orange (0.5 µg/mL; Sigma-Aldrich Canada, A6014) was added to each well, and cells were incubated for 10 minutes at 37°C in the dark. Fluorescence was then examined by microscopy using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope. Micro-Manager 1.3.39 imaging software (Copyright University of California, San Francisco, 2007) was used to capture images with a QImaging Retiga 1300 camera; (Nikon), and data were analyzed with ImageJ Macbiophotonics (National Institutes of Health, NIH). Representative images display the Red channel (568 nm) which were then extracted as a grayscale image using ImageJ. Mean fluorescence was quantified as the following ratio : (total red fluorescence of sample - total red fluorescence of sample

background) / (total red fluorescence of control - total red fluorescence of control background).

Detection of GFP-LC3 puncta formation : HepG2 cells were harvested on cover slips, transiently transfected with a cDNA plasmid encoding pEGFP-LC3 (generously provided by Dr Patrick Labonté, INRS-IAF, QC). Upon ConA treatment, media was removed and cells were fixed in 10% formalin phosphate buffer (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 min, then blocked for 1 hr in 1% BSA/PBS/NaN₃. A solution of 10 µg/ml DAPI diluted in PBS was used to stain the nuclei. Puncta formation was then examined in 5-10 transfected cells and quantified by fluorescent microscopy using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope. The Micro-Manager 1.3.39 imaging software was then used to capture images with a QImaging Retiga 1300 camera, and data were analyzed with ImageJ Macbiophotonics (NIH). Representative images display the GFP channel (488 nm) which were then extracted as a grayscale image using ImageJ. GFP-LC3 puncta formation was defined as bright dots >1.5 SD above the mean cytosolic fluorescence.

Immunoblotting procedures : HepG2 cells were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes and immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence.

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from HepG2 monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iqycler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): MT1-MMP (HS_Mmp14_1_SG QT00001533), BNIP3 (HS_BNIP3_1_SG QT00024178), COX-2

(HS_PTGS2_1_SG QT00040586), NANOS1 (HS_NANOS1_1_SG QT00219541). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control (β -Actin) RNA were measured by following a Δ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of β -Actin RNA were calculated by CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Transfection method and RNA interference : HepG2 cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against STAT3 (HS_Stat3_7 FlexiTube siRNA, S102662338), MT1-MMP (HS_Mmp14_6 HP siRNA, S103648841), NANOS1 (HS_NANOS1_5, S104177733) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using the Dharmafect transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The small interfering RNA and mismatch siRNA were all synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

RESULTS

Minocycline abrogates autophagic acidic vacuole formation, GFP-LC3 puncta formation and expression of BNIP3 in Concanavalin-A-activated HepG2 cells. ConA is a lectin reported to trigger inflammation and ECM degradation through MT1-MMP-mediated processes (Akla et al, 2012; Sina et al, 2010; Watanabe et al, 2013). More relevantly, ConA was recently found to trigger autophagy in U87 glioblastoma cells, a process known to involve MT1-MMP.²⁶ We therefore tested whether minocycline affected ConA-induced autophagy in HepG2 cells. Serum-starved HepG2 cells were treated with 30 µg/ml ConA in the presence of various concentrations of minocycline. Acridine Orange staining was then used to assess the extent of autophagic acidic vacuole formation (Fig.1A, upper panels) as well as of GFP-LC3 puncta formation (Fig.1A, lower panels) which assays are indicative of autophagy processes. While both the Acridine Orange staining and GFP-LC3 signal in response to 10 µM minocycline were absent (not shown), we found that ConA induced acidic vacuole and GFP-LC3 puncta formation (Fig.1B) and that minocycline dose-dependently antagonized that induction with a maximal effect at 3 µM (Fig.1C). To further document the molecular effects of minocycline on ConA-induced autophagy, we used immunofluorescent staining to assess the intracellular expression of autophagy biomarker BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3) (Fig.2A). We found that cytoplasmic BNIP3 expression was significantly increased in ConA-activated HepG2 cells and that minocycline completely abolished that increase (Fig.2B).

Minocycline antagonizes the expression of MT1-MMP and COX-2 proteins in Concanavalin-A-activated HepG2 cells. In addition to BNIP3 expression, we next determined whether minocycline also altered the expression of MT1-MMP and COX-2, two inter-related inflammation-associated biomarkers well documented to be increased by ConA (Akla et al, 2012; Sina et al, 2010). Cell lysates were isolated from ConA-treated HepG2 cells, and we found that ConA dose-dependently triggered MT1-MMP, COX-2 and BNIP3 protein expression (Fig.3A and B). When minocycline was concomitantly added to cells with ConA, we observed a dose-dependent reversal of the ConA-mediated effects on all three induced biomarkers (Fig.3C and D). Altogether, this cellular and molecular evidence confirmed that

minocycline can reverse the effects of ConA on markers of autophagy and inflammation processes.

MT1-MMP is required in Concanavalin-A-induced BNIP3 expression and formation of autophagic acidic vacuoles. Given that MT1-MMP was recently ascribed intracellular signal transducing functions in inflammation and in autophagy (Akla et al, 2012; Pratt et al, 2012), we next assessed the contribution of MT1-MMP to ConA-mediated induction of BNIP3, COX-2 and autophagic acidic vacuole formation in HepG2 cells. Specific MT1-MMP gene silencing was performed as described in the Methods section and was shown to antagonize ConA-induced BNIP3 and COX-2 protein expression as efficiently as does minocycline (Fig.4A). Gene expression was also assessed under these same conditions and similar effects were observed for MT1-MMP, BNIP3 and COX-2 transcriptional regulation (Fig.4B), suggesting that ConA requires MT1-MMP to relay intracellular signalling that affects gene transcription. When autophagic acidic vacuole formation was assessed, we observed that ConA triggered autophagy and that this was similarly antagonized upon either MT1-MMP silencing or minocycline treatment (Fig.4C). Altogether, these data suggest that MT1-MMP-mediated signalling is mandatory in the induction of autophagy and inflammation in ConA-activated HepG2 cells and that minocycline may efficiently affect these processes by regulating MT1-MMP expression itself.

STAT3 and NANOS1 are important signaling and upstream regulators in Concanavalin-A-induced MT1-MMP. Recent evidences has indicated a role for signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-mediated signaling in the transcriptional regulation of COX-2 and of colony-stimulating factors in ConA-activated mesenchymal stromal cells (Akla et al, 2012; Zgheib et al, 2013). Given that NANOS1 has also been suggested to upregulate MT1-MMP expression at both the gene and protein levels in epithelial tumor cells (Bonnomet et al, 2008), we therefore decided to silence STAT3 and NANOS1 gene expression and assess their respective impact on ConA-induced MT1-MMP expression. We found that the induction of MT1-MMP protein expression by ConA was abrogated in conditions where either STAT3 or NANOS1 were silenced (Fig.5A). When MT1-MMP gene expression was assessed, we further found that minocycline significantly reduced the basal levels of MT1-

MMP and that this inhibitory effect required the expression of STAT3 and NANOS1 (Fig.5B; black bars). Interestingly, NANOS1 silencing also abrogated ConA-induced gene expression of MT1-MMP while STAT3 silencing still allowed weak induction of MT1-MMP by ConA (Fig.5B; grey bars). STAT3 and NANOS1 therefore represent crucial upstream contributors in the transcriptional regulation of MT1-MMP by ConA, and in the mechanism of action of minocycline. Finally, we also show that specific gene silencing of NANOS1 and of STAT3 was achieved and did not affect the mRNA levels of each other (Fig.5C).

Minocycline inhibits Concanavalin-A-induced NANOS1 gene expression and phosphorylation of STAT3. Given the molecular rationale that links NANOS1 to MT1-MMP, we next tested their interdependence regarding ConA action. HepG2 cells were treated with various concentrations of ConA which resulted in a linear correlation ($r^2 = 0.976$) between NANOS1 and MT1-MMP expression, and which confirmed that ConA triggers MT1-MMP and NANOS1 in a dose-dependent manner (Fig.6A). Minocycline, which had no effect on basal endogenous NANOS1 expression (not shown), was next added to ConA-treated cells and was found to decrease both MT1-MMP and NANOS1 gene expression levels in dose-dependent fashion (Fig.6B). The impact of NANOS1 was also assessed in ConA signaling. We found that ConA effectively triggered STAT3 phosphorylation over time, and that minocycline lowered this phosphorylation (Fig.6C). When NANOS1 gene expression was silenced, ConA was unable to trigger STAT3 phosphorylation (Fig.6D). Collectively, this suggests that NANOS1 is an important upstream intermediate in the ConA-mediated signaling which can also be targeted by minocycline.

Concanavalin-A-induced autophagic acidic vacuole formation requires NANOS1 and STAT3. Our previous data showed the absolute requirement for MT1-MMP in ConA-induced autophagic acidic vacuole formation (Fig.4C). We next examined the involvement of NANOS1 and of STAT3 in the ConA-mediated induction of acidic vacuoles. Transient gene silencing was performed for NANOS1, STAT3, and for MT1-MMP, then cells were treated with ConA and stained with Acridine Orange. We observed diminished acid vacuole formation in both MT1-MMP and STAT3 silencing, while incomplete inhibition was

observed in cells silenced for NANOS1 gene expression (Fig.7).

DISCUSSION

Recently reported MT1-MMP-associated intracellular signaling functions link MT1-MMP-mediated ER stress, autophagy and inflammation to the invasive and chemoresistance signature of cancer cells (Sun et al, 2013; Hanahan et Weinberg, 2000). In line with these new functions, the present study further strengthens the conception that ConA-induced autophagy and inflammation processes requires a combined MT1-MMP upstream induction and MT1-MMP downstream signaling pathways activation which involve NANOS1 and which can both be abrogated by minocycline.

Our finding that minocycline efficiently alters the relationship that exists between MT1-MMP and NANOS1 expression (Fig.6A) does not only impact on inflammation/autophagy processes, but also on the acquisition of chemoresistance and invasive properties of cancer cells, often correlated to the EMT process. Indeed, NANOS1 is a protein involved in a variety of processes including cell migration and oogenesis in *Drosophila* (Köprunner et al, 2001; Forbes et Lehmann, 1998). NANOS1 expression is tightly controlled by the cell surface adhesion molecule E-cadherin, the lowered expression of which is frequently associated with tumor formation and progression (Strumane et al, 2006). In fact, high expression of NANOS1 was reported to correlate with low levels of E-cadherin and with aggressive tumor behavior (Kitadai et al, 1996; Polette et al, 2005). Interestingly, overexpression of MT1-MMP was recently demonstrated to induce both EMT processes associated with breast tumour progression (Pulyaeva et al, 1997) and the generation of cells exhibiting cancer stem cells properties and decreased expression of E-Cadherin (Yang et al, 2013). How NANOS1 induces invasiveness still remains unclear but has been, in part, associated with MT1-MMP upregulation (Bonnomet et al, 2008). In fact, NANOS1 overexpression upregulated MT1-MMP at the mRNA and protein levels, and this was shown to promote cell migration (Bonnomet et al, 2008). It is however still unclear whether the transducing events involved in this process may also concomitantly trigger some autophagy. Our data however confirm NANOS1 involvement in ConA-induced MT1-MMP and BNIP3 expression and autophagic acidic vacuole formation. Given that the interdependency between NANOS1 and MT1-MMP decreases upon minocycline treatment, it is tempting to

hypothesize that EMT processes can also be efficiently targeted in this way.

A new finding that we bring to our understanding of ConA-induced MT1-MMP mechanism is the role of STAT3 and more specifically of its phosphorylated intermediate. Silencing of STAT3 lead to a reduction in ConA-induced MT1-MMP, while NANOS1 gene silencing also abrogated this phosphorylation event. Whether the effect of NANOS1 knockdown on STAT3 phosphorylation is a secondary effect due to inflammation is indirectly supported by the fact that minocycline efficiently reversed ConA-induced COX-2 expression (Fig.4A). However, this remains to be further investigated possibly through gene silencing strategies of COX-2. Given that minocycline efficiently inhibited ConA-induced NANOS1 expression, ConA-induced STAT3 phosphorylation, and ConA-induced autophagic acidic vacuole formation, we suggest that ConA-mediated signaling can trigger a pathway involving the NANOS1/pSTAT3 signaling axis to induce MT1-MMP (Fig.8). These observations indicate a potential dual role for pSTAT3 that would take place not only upstream of MT1-MMP induction through NANOS1, but also downstream. Indeed, once induced, MT1-MMP triggers inflammation and autophagy through pathways that involve STAT3 phosphorylation. It was shown that the ConA-induced inflammatory response is mediated by MT1-MMP induction which, in turn, activates the JAK/STAT3 signaling pathway in mesenchymal stromal cells (Akla et al, 2012). More recently, ConA-induced MT1-MMP, possibly through Toll-like receptor (TLR) activation, also triggered JAK/STAT3 signaling to generate pro-angiogenic and immunomodulatory cytokine expression (Fig.8, dotted lines) (Zgheib et al, 2013; Vinnakota et al, 2013). Interestingly, recent observations point to a potential anti-angiogenic property of minocycline (Pourgholami et al, 2013). Whether minocycline also inhibits MT1-MMP-mediated angiogenesis is currently unknown. On the other hand, what is known is that STAT3 gene silencing does not prevent ConA-induced proMMP-2 activation, an event that requires MT1-MMP induction and targeting at the cell surface (Akla et al, 2012). It is therefore unlikely that STAT3 phosphorylation status may modulate MT1-MMP expression. How ConA may trigger NANOS1 transcription remains unknown to this date. Several transduction pathways have been recently reported to be triggered by ConA and these included ERK, RhoA/ROK, JAK/STAT, and NF κ B. Unfortunately, the exact mechanisms involved remain elusive although evidence suggests

that cell surface TLR may contribute to transduce ConA signaling (Zgheib et al, 2013). As for minocycline's anti-ConA effects observed in this study, the only conclusions that can be safely withdrawn are that it acts as a signal transducer inhibitor affecting gene transcription that will be the object of future investigations.

In addition to its antibiotic and anti-inflammatory properties, minocycline could therefore be envisioned as a promising agent to complement current cancer treatment modalities due to its combined anti-inflammatory and anti-tumoral effects. Indeed, it has been shown that minocycline inhibited growth of several types of tumor cells including epithelial ovarian cancer cells and glioma cells (Liu et al, 2013; Pourgholami et al, 2012). Interestingly, doxocycline is among other members of the tetracycline molecules which, similarly to minocycline, possess MMP inhibitory functions. Although doxocycline's mechanism of action on cancer cell growth remains unclear, it also has been associated with suppression of MMP expression and, more specifically of MT1-MMP, in pre-clinical models of malignant epithelial cells (Soulié P et al, 2005). Whether similar inhibitory mechanisms were also involved in doxocycline effects on melanoma (Shieh et al, 2010), renal and prostate cancer (van den Bogert et al, 1986), and breast cancer (Meng et al, 2000) remains to be confirmed. Accordingly, in this study we demonstrate that minocycline inhibits ConA-induced MT1-MMP in a HepG2 hepatoma cell model.

Minocycline's anti-inflammatory properties are also believed to be mediated through the inhibition of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 (Ataie-Kachoe et al, 2013; Pourgholami et al, 2013). We further demonstrated here that inflammation, as monitored by COX-2 induction, requires an MT1-MMP/STAT3 signaling axis (Akla et al, 2012) and is inhibited by minocycline in ConA-activated HepG2 cells. Altogether, these observations suggest that minocycline could alter the MT1-MMP-mediated JAK/STAT3 signaling axis which makes kinases upstream from the JAK family possible targets for minocycline. We also present evidence that ConA-induced autophagy is inhibited by minocycline as shown by decreased BNIP3, GFP-LC3 puncta formation and autophagic acidic vacuole formation. As minocycline also inhibits MT1-MMP expression, one could hypothesize that minocycline abrogates ConA-induced-autophagy by preventing MT1-MMP

expression and/or signaling functions. Given that ConA was reported to activate and transduce part of its signaling through cell surface TLR receptors (Zgheib et al, 2013), minocycline may therefore also be envisioned as targeting some TLR receptor-mediated signaling.

We conclude that in HepG2, ConA-induced-inflammation and autophagy is mediated through MT1-MMP and can be inhibited by minocycline. We suggest that minocycline exerts part of its non-antibiotic functions through the inhibition of inflammation and autophagy by targeting signaling intermediates involved in upstream regulation of MT1-MMP such as TLR, or NANOS1, but also by impairing subsequent downstream signaling pathways such as JAK/STAT3.

ACKNOWLEDGMENTS

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). JP is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awardee.

FUNDING

This study was funded by a grant from the NSERC to BA.

COMPETING INTERESTS

The authors disclose no potential conflicts of interest.

Fig.1

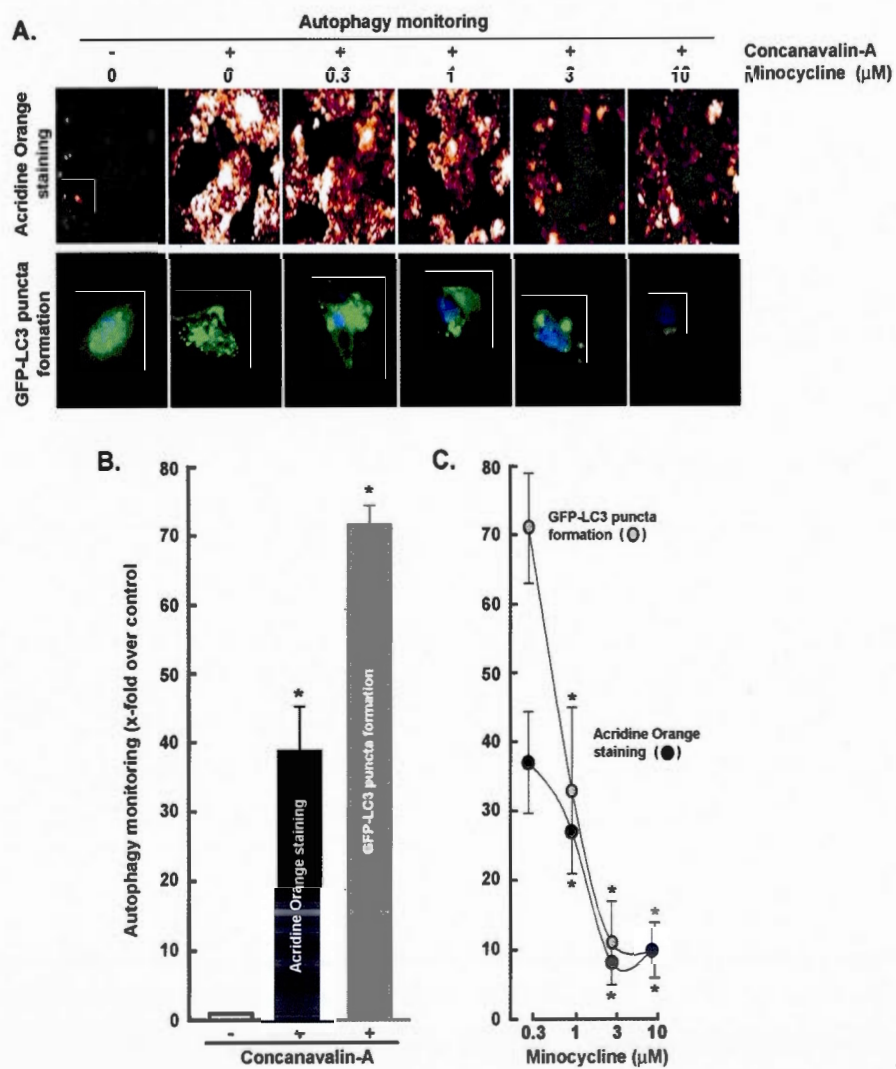


Fig.1 : Minocycline inhibits the induction of acidic vacuoles in Concanavalin-A-activated HepG2 cells. Serum-starved HepG2 hepatoma cells were treated with or without 30 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin-A (ConA) for 24 hours in the presence of various concentrations of minocycline (0-10 μM). (A) Upper panels : Cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and acidic vacuole formation examined by fluorescent microscopy. Lower panels : Prior to ConA treatment, cells were transiently transfected with a plasmid cDNA encoding GFP-LC3. Fluorescent puncta formation was assessed as as described in the methods section. (B) ConA-induced autophagy was monitored by Acridine Orange staining (black bars) or upon GFP-LC3 puncta formation (grey bars), and compared to their respective untreated control cells (white bars). (C) Minocycline effect on Con-A-treated cells was similarly quantified for different concentrations in ConA-treated cells by Acridine Orange staining (closed circles) or GFP-LC3 puncta formation (grey circles). Acridine Orange staining and GFP-LC3 puncta formation pictures are representative out of 3 independent experiments, and corresponding fluorescence analysis are shown. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk (*) identifies such significance.

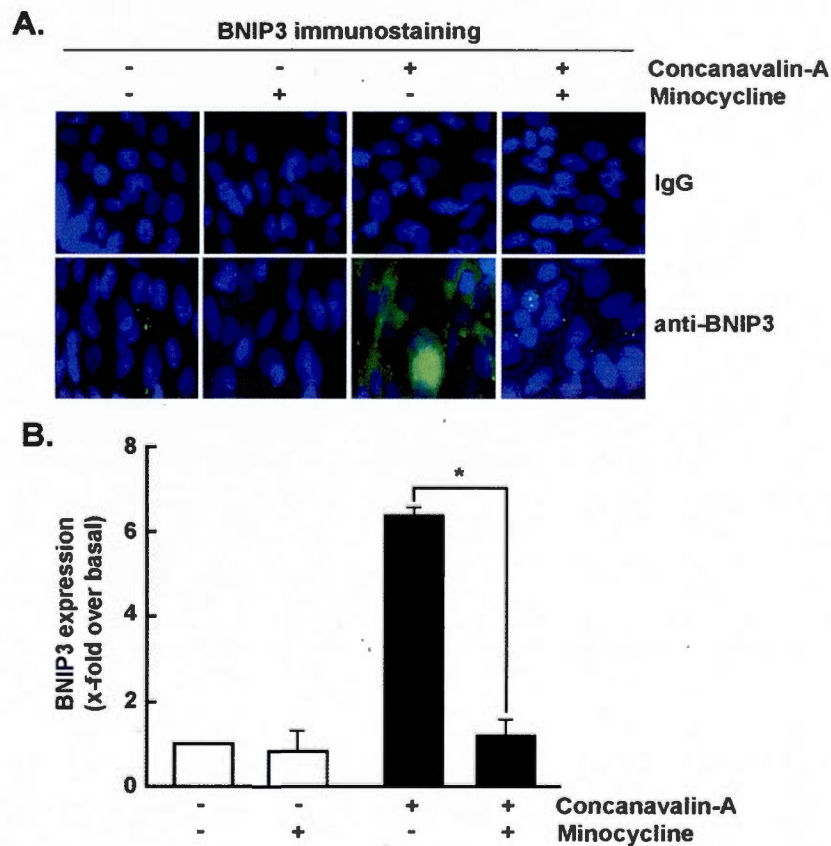
Fig.2

Fig.2 : Minocycline inhibits the induction of BNIP3 in Concanavalin-A-activated HepG2 cells. Serum-starved HepG2 hepatoma cells were treated with or without 30 μ g/ml Concanavalin-A (ConA) for 24 hours in the presence of 10 μ M minocycline. (A) Cells were fixed and immunostained with either IgG or anti-BNIP3 antibody as described in the Methods section. DAPI-stained nucleus was visualized in blue (B) Fluorescence quantification was performed in control (white bar) and ConA-treated (Black bar) cells and is representative out of 3 independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk (*) identifies such significance.

Fig.3

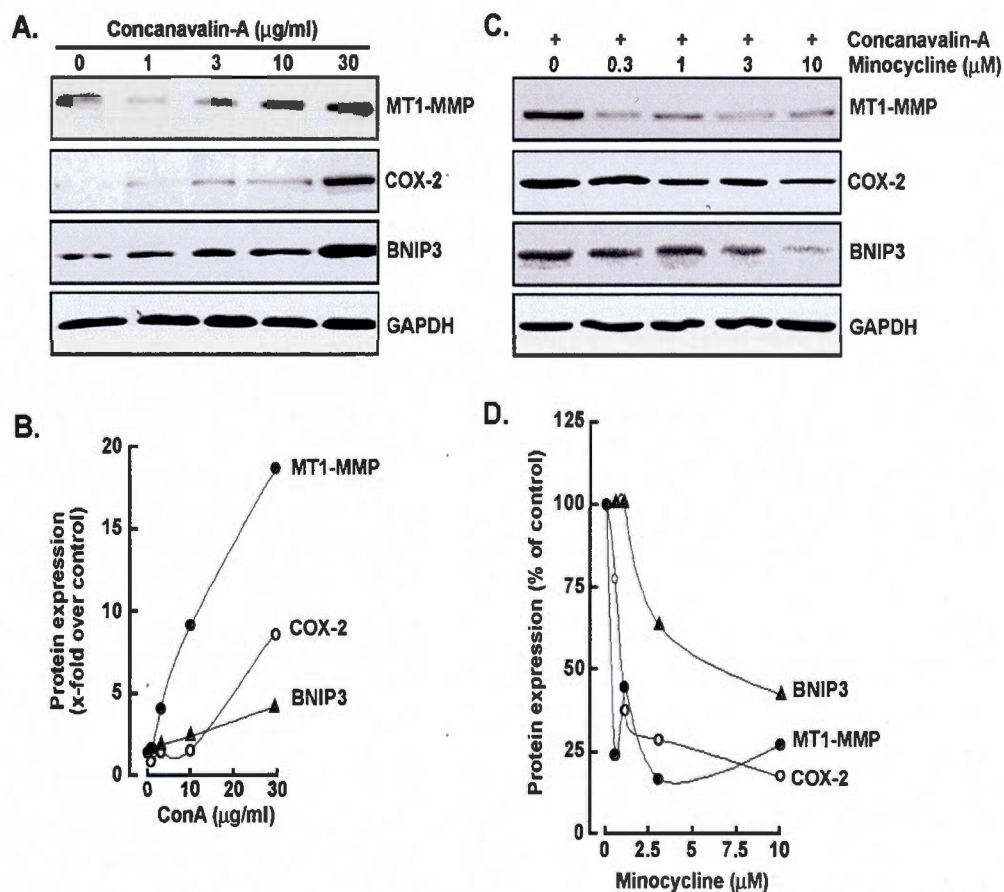


Fig.3 : Minocycline antagonizes the protein expression of BNIP3, MT1-MMP, and COX2 in Concanavalin-A-activated HepG2 cells. Serum-starved HepG2 hepatoma cells were treated with various Concanavalin-A (ConA) concentrations for 24 hours (A), or co-treated with ConA (30 $\mu\text{g/ml}$) with various concentrations of minocycline (C). Cell lysates were isolated and electrophoresed as described in the Methods sections. Scanning densitometry measurements were performed (B, D) on two independent experiments. A representative scanning densitometry profile is shown for the respective treatments. Data represent mean values from duplicates.

Fig.4

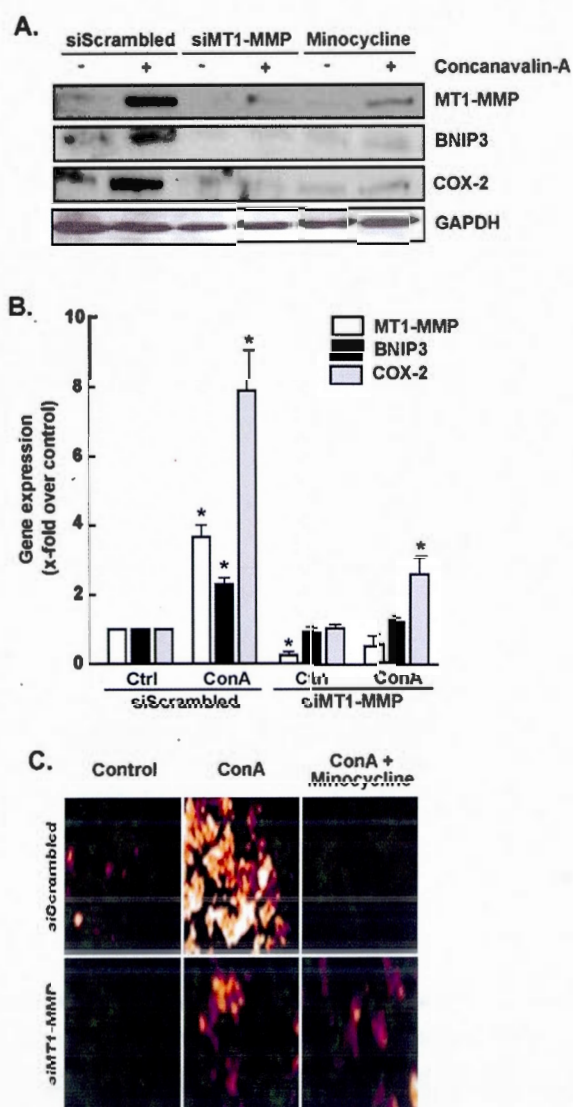


Fig.4 : MT1-MMP is required for Concanavalin-A-induced BNIP3 expression and formation of acidic vacuoles. Serum-starved HepG2 hepatoma cells were transiently transfected with a control siRNA (siScrambled) or an siRNA directed against MT1-MMP (siMT1-MMP), then the cells were treated with 30 µg/ml Concanavalin-A (ConA) for 24 hours in the presence or absence of 10 µM minocycline. (A) Cell lysates were isolated, electrophoresed and immunodetection performed as described in the Methods sections. (B) Total RNA was isolated from cells transfected with either a scrambled siRNA sequence (siScr) or a specific siRNA against MT1-MMP (siMT1-MMP), and followed by 30 µg/ml ConA treatment. cDNA was then synthesised and qRT-PCR performed as described in the Methods section. A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk (*) identifies such significance. (C) Cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and acidic vacuole formation examined by fluorescence microscopy in control, ConA-, and ConA/minocycline-treated cells.

Fig.5

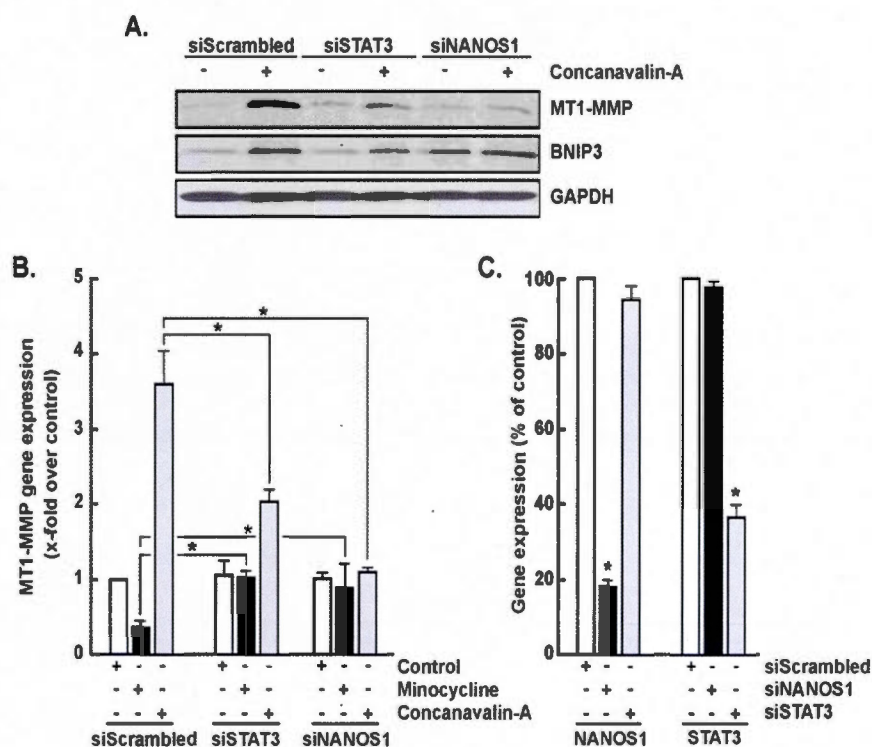


Fig.5 : STAT3 and NANOS1 gene silencing abrogate Concanavalin-A-induced MT1-MMP and BNIP3 expression. HepG2 hepatoma cells were transiently transfected with a control siRNA (siScrambled) or an siRNA directed against STAT3 (siSTAT3) or NANOS1 (siNANOS1), then serum-starved cells were treated with 30 μ g/ml Concanavalin-A (ConA) for 24 hours. (A) Cell lysates were isolated, electrophoresed, and immunodetection performed as described in the Methods sections. (B) MT1-MMP gene expression was assessed in cells that were treated with 10 μ M minocycline or 30 μ g/ml ConA. Total RNA was isolated, cDNA synthesized and qRT-PCR performed as described in the Methods

section. (C) The inter-relationship between NANOS1 and STAT3 gene expression was assessed in cells that were either silenced for NANOS1 (siNANOS1, black bars) or silenced for STAT3 (siSTAT3, grey bars). Total RNA was isolated, cDNA synthesized and qRT-PCR performed as described in the Methods section. A representative qPCR profile, out of three independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk (*) identifies such significance.

Fig.6

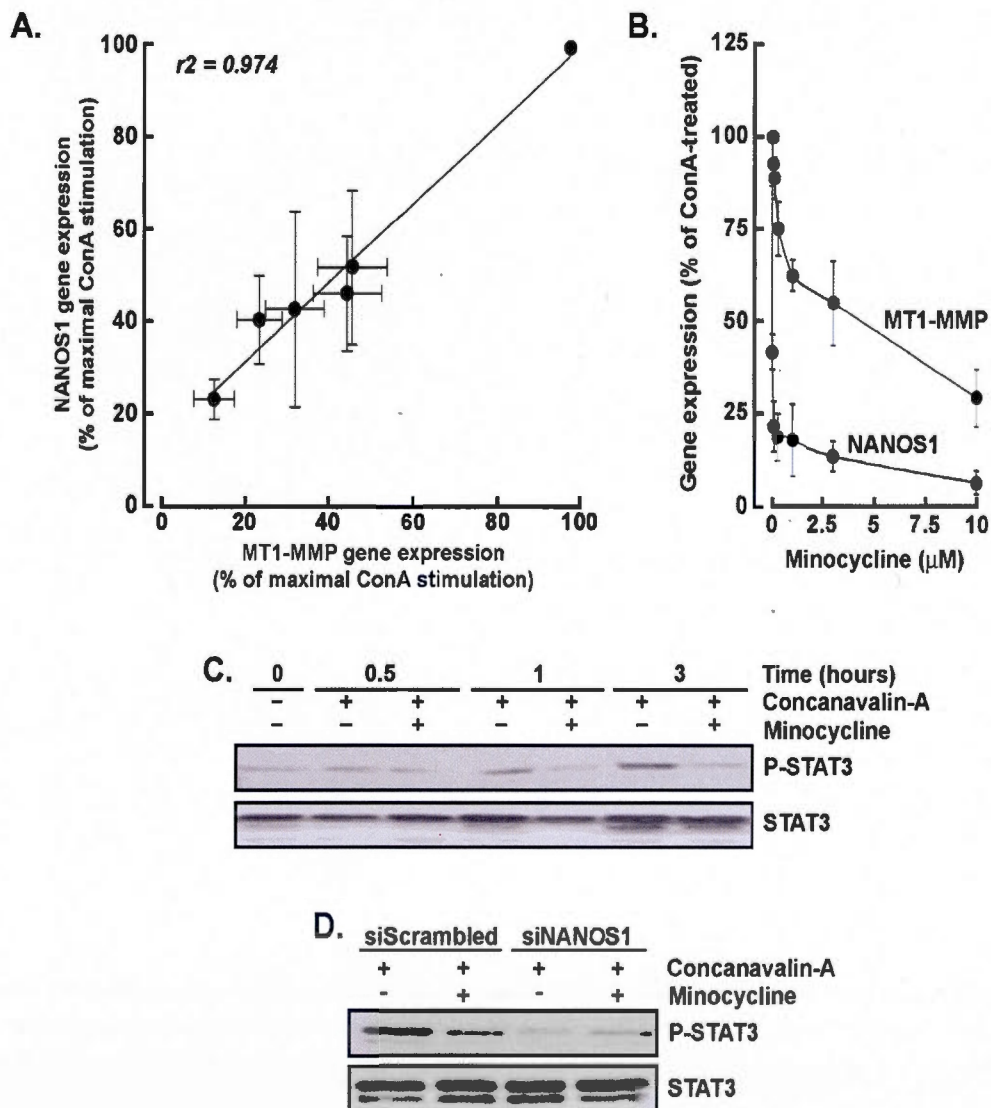


Fig.6 : Minocycline inhibits Concanavalin-A-induced NANOS1 expression and phosphorylation of STAT3. (A) Serum-starved HepG2 hepatoma cells were treated with increasing ConA concentrations. NANOS1 and MT1-MMP gene expression was expressed as the percent of maximal ConA-induced effect for each gene. (B) ConA-treated HepG2 hepatoma cells were incubated with up to 10 μ M minocycline for 24 hours. Total RNA was isolated, cDNA synthesised and qPCR performed as described in the Methods section. (C) The levels of STAT3 phosphorylation were assessed in cells that were treated with 30 μ g/ml ConA in the presence or absence of 10 μ M minocycline, or in (D) cells that were transiently transfected with either a control siRNA (siScrambled) or an siRNA directed against NANOS1 (siNANOS1). A representative qPCR profile, from two independent experiments, is shown for the corresponding genes. Data represent mean values from triplicates.

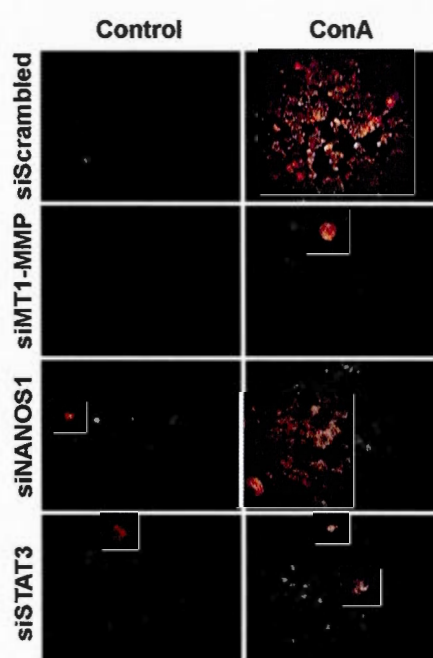
Fig.7

Fig.7 : Concanavalin-A-induced autophagic acidic vacuole formation requires NANOS1 and STAT3. HepG2 hepatoma cells were transiently transfected with a control siRNA (siScrambled) or an siRNA directed against MT1-MMP, (siMT1-MMP), STAT3 (siSTAT3) or NANOS1 (siNANOS1). Serum-starved cells were treated with 30 μ g/ml Concanavalin-A (ConA) for 24 hours, then cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and acidic vacuole formation examined by fluorescence microscopy.

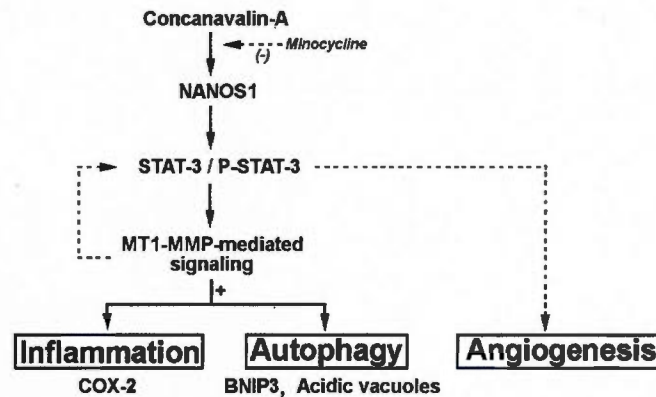
Fig.8

Fig.8 : Minocycline exerts anti-inflammatory and anti-autophagy action in ConA-activated hepatoma cells. Concanavalin-A (ConA) triggers STAT3 phosphorylation and NANOS1 gene expression in HepG2 cells. NANOS1 and STAT-3 phosphorylation are upstream prerequisite for ConA-mediated MT1-MMP gene expression which, in turn, triggers the inflammatory biomarker cyclooxygenase (COX)-2 expression, as well as the autophagy biomarker BNIP3 and acidic vacuole formation. Minocycline can exert its effects by inhibiting ConA-induced STAT3 phosphorylation, or directly on either MT1-MMP or NANOS1 transcriptional regulation. *Dotted lines* : Minocycline exerts anti-angiogenic effects (Garrido-Mesa et al, 2013). An alternate feedback loop was recently suggested to occur (Zgheib et al, 2013), where MT1-MMP contributed to STAT3 phosphorylation, which in turn impacted on proangiogenic transcription of proangiogenic cytokines.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le cancer, en général, est caractérisé par des signatures moléculaires précises (Schildkraut et al., 2013). À la base, les cancers dérivent tous d'anomalies à l'ADN non réparé se traduisant par un dérèglement cellulaire complexe impliquant une perte de contrôle dans de multiples voies de signalisation moléculaire (Conde-Perezprina, Leon-Galvan et Konigsberg, 2012). Cette perte d'homéostasie va conduire de façon commune à une prolifération cellulaire anarchique à l'origine de la tumeur. Une fois la tumeur diagnostiquée, il existe principalement deux options stratégiques lors de la chimiothérapie, soit viser sa destruction en ciblant des processus cellulaires vitaux tuant les cellules cancéreuses, mais également des cellules saines, ou cibler de façon plus spécifique des mécanismes moléculaires clés impliqués dans la croissance tumorale et ultimement la formation de métastases. Dans ce mémoire, mes recherches se sont attardées à des processus impliqués à la fois dans la croissance de la tumeur, mais également dans des mécanismes de survie et de résistance tumorale. Parmi les signatures moléculaires agissant à titre d'empreintes caractéristiques du cancer, une catégorie se démarque autant pour son action directe dans l'invasion tumorale, que pour son implication dans des voies de signalisation moléculaire clés associées à la résistance tumorale, il s'agit des MMP, dont plus spécialement la MT1-MMP (Rozanov *et al.*, 2008).

Importance du ciblage pharmacologique de la MT1-MMP

La contribution directe des MMP dans le caractère invasif des tumeurs (Figure 4.1) en fait une cible de choix dans le développement de nouveaux médicaments. Toutefois, vu l'inefficacité liée à des problèmes de sélectivité (Zucker et Cao, 2009), il pourrait être favorable de plutôt concentrer les efforts sur des MMPs clés jouant un rôle central, non seulement par leurs activités protéolytiques, mais également par leurs activités signalétiques. On ciblerait ainsi à la fois plusieurs processus en s'attaquant à une seule cible. À la lumière

des évidences documentées ces dernières années, il est raisonnable de penser que la MT1-MMP est l'une des plus importantes MMP. En effet, sa contribution au phénotype agressif des tumeurs (Etoh *et al.*, 2000), jumelé à son implication à des voies de signalisations participant à la chimiorésistance comme l'autophagie (Pratt *et al.*, 2012), en fait une cible de choix. Toutefois un criblage pharmacologique efficace de ses fonctions signalétiques passe par une meilleure compréhension de l'implication de son domaine cytoplasmique dans des processus moléculaires impliqués dans diverses étapes de la progression tumorale.

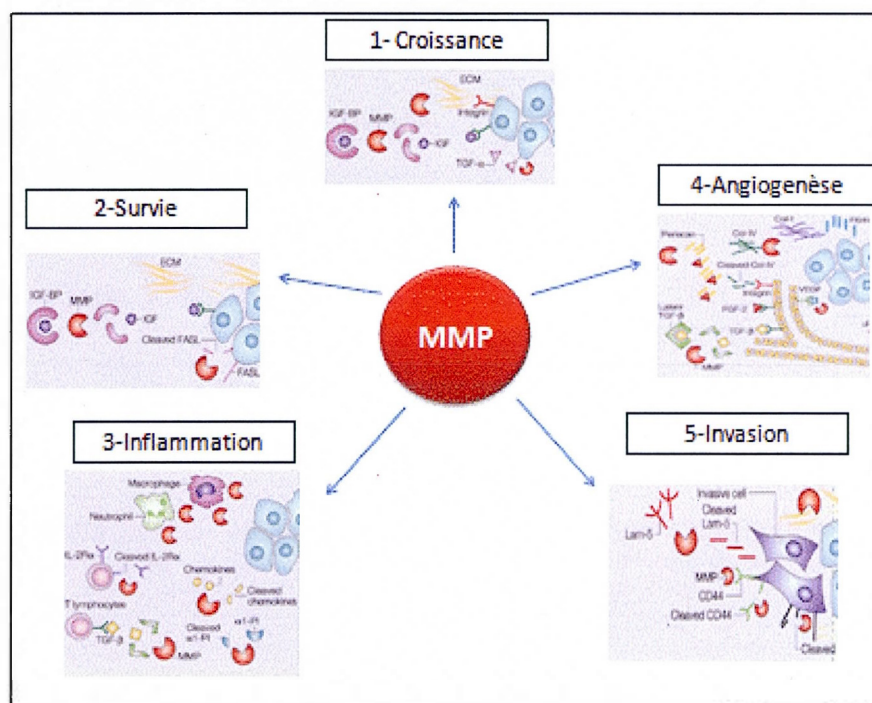


Figure 4.1 : Les 5 principales fonctions pro-tumorales des MMPs. 1) Les MMPs favorisent la croissance tumorale en clivant la protéine IGF-BP générant des précurseurs pour la synthèse de facteurs de croissance. 2) Les MMPs peuvent promouvoir la survie cellulaire par clivage de molécules pro-apoptotiques comme FASL. 3) Les MMPs peuvent inhiber des réactions immunes contre les cellules cancéreuses en clivant diverses chemokines

qui ne peuvent plus attirer des leucocytes et par conséquent générer de l'inflammation locale. 4) Les MMPs peuvent promouvoir l'angiogenèse en augmentant la biodisponibilité de divers facteurs de croissances endothéliaux dont le VEGF. 5) Les MMPs participent à l'invasion tumorale en dégradant diverses composantes de la MEC ou en activant d'autres MMPs.

[Adapté de Egeblad et Werb, 2002]

Expression des MMPs dans le cancer et implication la de la MT1-MMP dans la résistance tumorale

Les MMPs sont des enzymes protéolytiques très peu exprimés en condition physiologique et elles possèdent des fonctions biologiques importantes, notamment au cours de l'embryogenèse (Corbel, Boichot et Lagente, 2000). Elles sont en général surexprimées dans des conditions pathologiques telles que le cancer (Yan et Boyd, 2007). En effet, le niveau d'expression de certaines MMPs comme la MMP-2 et la MMP-9 est très élevé dans la majorité des cancers et est également associé à un mauvais pronostic (Yan et Boyd, 2007). Toutefois, il s'agit de MMPs solubles sécrétées dans le milieu extracellulaire qui nécessitent une activation par d'autres MMPs pour être en mesure de contribuer à la progression tumorale. La MT1-MMP contribue de façon majeure à l'activation de ces deux MMPs en initiant une cascade protéolytique conduisant à leur activation. En effet, la MT1-MMP est requise dans le mécanisme d'activation de la proMMP-2 qui, à son tour, est capable d'activer la proMMP-9 latente présente dans le milieu extracellulaire (Toth *et al.*, 2003). Leurs rôles pathogènes ne dépend donc pas seulement de leur niveau d'expression, mais plus encore, de l'expression de molécules activatrices clé comme la MT1-MMP. Surexprimée dans beaucoup de cancers, la MT1-MMP contribue à l'agressivité des tumeurs, notamment en favorisant la formation de métastases (Shiomi et Okada, 2003). Une étude clinique sur des patients ayant des neuroblastomes a montré des taux de survie inférieurs chez les patients exprimant la MT1-MMP (Tableau 4.1) (Zhang *et al.*, 2012). Les oncologues sont très souvent confrontés à des mécanismes de chimiorésistance lors des thérapies anti-cancers (Komarova et Wodarz, 2005). En effet, les cellules tumorales soumises à divers traitements

ont la capacité de s'auto réparer par divers mécanismes dont l'autophagie (Chen *et al.*, 2010). De plus, le processus d'autophagie est également une source d'alimentation pour les tumeurs en hypoxie favorisant leur croissance (Chen *et al.*, 2010). Dans notre étude, nous mettons en évidence l'implication de la MT1-MMP dans l'autophagie dans un modèle cellulaire d'hépatome humain. En effet, l'utilisation de siRNA contre la MT1-MMP a permis de démontrer une diminution importante de la formation de vacuoles acides et de l'expression du biomarqueur autophagique BNIP3 lors d'un traitement à la ConA, une condition connue pour induire un phénotype autophagique dans des cellules d'hépatomes humains (Chang *et al.*, 2007).

Temps (mois)	Taux de survie (valeur relative %)	
	-MT1-MMP (negatif)	+MT1-MMP (positif)
0	100	100
15	90	81
20	82	26
30	58	16

Tableau 4.1 : Taux de survie relatif des patients atteints d'un neuroblastome exprimant ou non la MT1-MMP. Des échantillons tumoraux ont été prélevés chez différents patients (N=44) atteints d'un neuroblastome afin de déterminer si la MT1-MMP est exprimée ou non dans le but d'en comparer les taux de survie. Si l'on observe le taux de survie à 20 mois, environ 82 % des patients sont vivants comparativement à moins de 26 % des patients exprimant la MT1-MMP.

[Adapté de Zhang et al, 2002]

Un axe de signalisation impliquant NANOS1 et STAT3 dans la régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP

L'expression de la MT1-MMP est finement régulée par divers facteurs de transcription capables de se lier à sa séquence promotrice. Parmi ces facteurs, EGR1 et SP1 sont connus comme étant les principaux facteurs transcriptionnels de sa régulation (Haas *et al.*, 1999). La régulation de la MT1-MMP est très complexe et affectée à divers niveaux incluant sa transcription, sa traduction, son activité catalytique et sa dégradation (Hiden *et al.*, 2008). Récemment, une étude a montré que l'expression de MT1-MMP serait également régulée par des micro-ARN comme le miR-133a (Xu et Wang, 2013). Plus intéressant encore, la phosphorylation de la MT1-MMP sur son unique résidu tyrosine situé à la position 573 de son domaine cytoplasmique serait impliquée dans la modulation de diverses voies de signalisation régulant le trafic vésiculaire et l'invasion tumorale (Nyalendo *et al.*, 2007). La phosphorylation de la Y⁵⁷³ de la MT1-MMP serait médiée par la kinase SRC et impliquerait également la voie de signalisation JAK/STAT (Moss *et al.*, 2009). STAT3 serait le plus important de cette famille au niveau de la régulation des MMPs. En effet, son activation par phosphorylation serait corrélée à l'augmentation de diverses MMPs dans diverses lignées cellulaires (Chen *et al.*, 2002). Afin de savoir si STAT3 est associé à la régulation de la transcription de la MT1-MMP, nous avons utilisé un ARN interférant contre STAT3 suivie d'un traitement cellulaire à la ConA, une condition connue pour induire à la fois sa phosphorylation et l'expression de la MT1-MMP (Zgheib *et al.*, 2013). Les résultats obtenus montrent que l'induction de la MT1-MMP par la ConA est antagonisée en absence de phosphorylation de STAT-3. Une étude récente a également montré que la protéine NANOS1, associée à la répression de molécules d'adhérence telle la E-Cadherine, serait impliquée dans le rôle invasif des tumeurs. En effet, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses de poumons et capable de réguler l'expression de la MT1-MMP (Bonnomet *et al.*, 2008). Nous avons donc, lors d'une expérience préliminaire, analysé l'expression génique de NANOS1 dans des biopsies de tumeurs cérébrales de différents grades afin de déterminer si NANOS1 pouvait corrélérer avec l'agressivité des tumeurs. Les résultats obtenus montrent une augmentation de son expression génique en fonction du grade de tumeurs (figure 4.2). Puisque que NANOS1 pourrait potentiellement être impliquée dans l'invasion

tumorale, nous avons voulu déterminer si elle avait un rôle dans l'induction de la MT1-MMP par la ConA. Nous avons donc utilisé un ARN interférant contre NANOS1 dans notre modèle cellulaire d'hépatome humain, ce qui a permis de démontrer que NANOS1 est requis dans l'induction de la MT1-MMP par la ConA. Sachant maintenant que NANOS1 et STAT3 sont tous deux impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP, nous avons voulu déterminer la relation entre ces deux molécules en déterminant la cascade de signalisation en aval de la MT1-MMP par l'utilisation d'ARN interférent. Les résultats obtenus montrent que la protéine NANOS1 est requise dans la cascade d'évènements menant à la phosphorylation de STAT3, alors que STAT3 n'est pas requise dans l'induction de NANOS1. Nous mettons donc en évidence pour la première fois l'implication d'un axe de signalisation NANOS1/STAT3 dans le mécanisme de régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP.

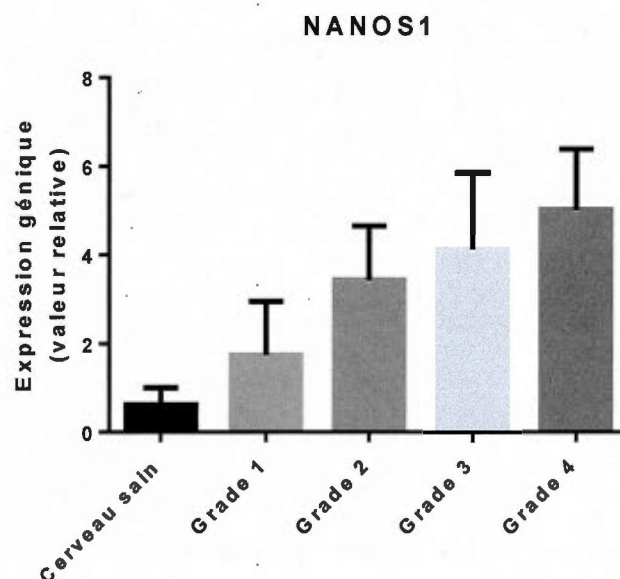


Figure 4.2 : Expression génique de NANOS1 dans des tissus sains ou des tissus de tumeurs cérébrales. L'ARN total provenant de tissus cérébraux humains sains ou cancéreux a été isolé et l'expression génique de NANOS1 a été déterminée par RT-qPCR sur les cDNA respectifs. Les résultats montrent une augmentation régulière de l'expression de NANOS1 en fonction du grade de la tumeur.

Contribution de l'inflammation et de l'autophagie dans le phénotype invasif des hépatomes humains

Les carcinomes hépatocellulaires sont des tumeurs malignes du foie représentant, à l'heure actuelle, la cinquième cause de mortalité par cancer au niveau mondial (Llovet, Burroughs et Bruix, 2003). Ils sont généralement diagnostiqués à un stade avancé ce qui limite l'efficacité d'intervention auprès des patients atteints. Les traitements conventionnels font appel principalement aux thérapies systémiques cytotoxiques et sont souvent peu efficaces (Bertino *et al.*, 2013). En effet, il est maintenant accepté par les oncologues que les

traitements plus ciblés, affectant des cibles moléculaires impliquées dans divers processus de la carcinogenèse, serait plus efficace. Les hépatomes sont, dans la plupart des cas, développés dans un microenvironnement inflammatoire chronique causé par des virus, des toxines et des troubles métaboliques du foie (Alison, Nicholson et Lin, 2011). Le mécanisme inflammatoire est complexe et implique des cyclo-oxygénases, particulièrement la COX-2 reconnue pour jouer un rôle clé en catalysant la conversion d'acide arachidonique en PGE2 qui sont impliquées dans la production de plusieurs métabolites pro-inflammatoires favorisant la tumorigenèse (Greenhough *et al.*, 2009). L'expression de la COX-2 est très élevée dans les carcinomes hépatocellulaires qui ont la particularité de la surexprimer à des stades précoces favorisant la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire nécessaire à leur progression (Cervello et Montalto, 2006). Il a été démontré chez la souris que la suppression de la COX-2 diminue la taille des tumeurs hépatocellulaires par des mécanismes affectant la prolifération cellulaire (Kern *et al.*, 2004). Il est maintenant connu que l'autophagie favorise la croissance des tumeurs non seulement par dégradation catabolique de matériel cellulaire leur générant de l'énergie nécessaire pour croître, mais également en étant impliquée dans les mécanismes de résistances tumorales (Liu, Mao et Liu, 2011). Une des principales raisons des insuccès des thérapies contre les carcinomes hépatocellulaires est la chimiorésistance (Meena *et al.*, 2013). En effet, une des particularités des hépatomes est de posséder une activité autophagique élevée qui favorise la réparation d'organelles endommagées par les agents thérapeutiques diminuant ainsi l'efficacité de traitement et du même coup, amplifiant la résistance tumorale secondaire (Ding *et al.*, 2011). Il a également été documenté que l'autophagie serait impliquée en tant que médiatrice dans l'invasion tumorale, le mécanisme demeure toutefois inconnu (Li *et al.*, 2013). Cette nouvelle information suggère un lien potentiel avec les MMPs. Dans notre étude, nous avons confirmé l'importance de la MT1-MMP dans des phénomènes autophagiques. En effet, l'utilisation d'ARN interférant contre la MT1-MMP ne permet plus l'induction par la ConA des vacuoles acides et du biomarqueur autophagique BNIP3. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant à la fois l'autophagie et l'inflammation, deux processus très actifs dans les carcinomes hépatocellulaires, pourrait favoriser une diminution de la progression tumorale et diminuer les phénomènes de résistance.

Implication du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans l'autophagie

Les MT-MMP sont ancrées à la membrane plasmique et ont la particularité de posséder de courts domaines cytoplasmiques d'environ 20 acides aminés dont les fonctions sont de plus en plus documentées et sont associées à des processus de signalisation impliqués dans la progression tumorale (Egeblad et Werb, 2002). Alors que les études des dernières années se sont principalement focalisées sur le rôle protéolytique des MT-MMP, la mise en évidence de l'implication de leur domaine cytoplasmique dans le cancer ouvre désormais la porte vers une meilleure compréhension de leurs fonctions en tant que molécule de signalisation. Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est documenté pour son implication dans la régulation de l'angiogenèse. Au niveau moléculaire, il régulerait l'expression transcriptionnelle du VEGF et également l'expression de NF- κ B le principal facteur de transcription de COX-2 (Soumni *et al.*, 2011). Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP participerait également à l'activation de la kinase SRC impliquée dans la migration cellulaire. Plus intéressant encore, cette activation est en mesure d'initier une cascade d'événements conduisant à l'activation de m-TOR qui est le régulateur négatif du processus autophagique (Eisenach *et al.*, 2010). La modulation de voies signalétiques impliquant m-TOR et le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP, suggère un rôle de la MT1-MMP dans l'autophagie. La relation entre le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP et l'autophagie a récemment été inférée (Pratt *et al.*, 2012). En effet, la surexpression d'un mutant recombinant de la MT1-MMP ne possédant pas de domaine cytoplasmique, était incapable d'induire un phénotype autophagique dans des cellules de glioblastomes, alors que la surexpression du type sauvage induisait la formation de puncta LC3, un biomarqueur associé à la formation de l'autophagosome. De façon similaire, nous avons montré que la MT1-MMP est requise dans l'acquisition du phénotype autophagique par la ConA. Nous avons également analysé, lors d'expériences complémentaires, l'expression génique du biomarqueur autophagique ATG9 impliqué dans l'étape initiale de la biogenèse de l'autophagosome dans des cellules de glioblastomes humains. Nous avons traité les cellules avec divers agents pouvant induire l'autophagie dans des conditions où l'expression de la MT1-MMP a été réprimée par un ARN interférant. Les résultats obtenus montrent une diminution importante de l'expression d'ATG9 induite par les divers agents lorsque la MT1-MMP est réprimée, confirmant une

corrélation entre la MT1-MMP et la formation de l'autophagosome (Figure 4.3). L'implication du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans le mécanisme de signalisation de l'autophagie demeure encore mal documenté. Il devient donc impératif d'accentuer les recherches afin de mieux comprendre le rôle et l'implication du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans des mécanismes tels que l'autophagie afin de développer des agents thérapeutiques anti-cancer plus ciblés.

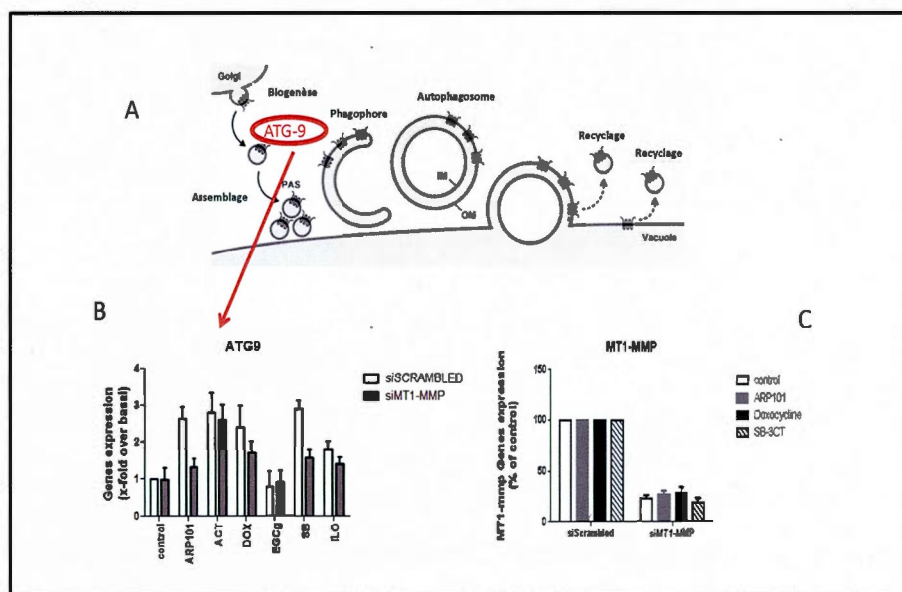


Figure 4.3: Effets de la MT1-MMP sur l'expression génique du biomarqueur pro-autophagique ATG9. A) Résumé des étapes de la formation de l'autophagosome. ATG9 est impliqué dans les étapes initiales d'assemblage permettant la synthèse du phagophore. B) Des cellules de glioblastomes (U87) ont été traitées avec divers agents pharmacologiques pour induire l'expression d'ATG9 dans des conditions siScrambled (contrôle) ou siMT1-MMP. L'expression génique d'ATG9 a ensuite été analysée par RT-qPCR. Les résultats montrent une diminution significative de l'expression d'ATG9 induite par l'ARP101, la DOX, le SB lorsque la MT1-MMP est réprimée, confirmant son importance dans le processus autophagique. C) Confirmation de la répression de MT1-MMP dans les différentes conditions.

[Adapté de Yammamoto et al, 2002; Desjarlais et Annabi, 2013]

Propriété anti-tumorale de la minocycline : Un rôle potentiel dans le traitement des hépatomes humains ?

Enfin, nous avons étudié l'impact de la minocycline, un antibiotique dérivé de la famille des tétracyclines, sur plusieurs processus contribuant au caractère agressif des carcinomes hépatocellulaires. Nous avons donc utilisé un modèle cellulaire HepG2 afin d'avoir un modèle *in vitro* représentatif d'hépatomes dans lequel des traitements avec ou sans ConA ont été effectués afin d'induire la MT1-MMP et de mimer une résistance tumorale secondaire. La ConA est reconnue pour induire un phénotype inflammatoire (Sina et al, 2010) et autophagique (Chang et al, 2007). La minocycline est un antibiotique de seconde génération utilisée depuis plus de 30 ans pour ses propriétés bactéricides (Ji *et al.*, 1993). Plusieurs études récentes lui confèrent des propriétés non-antibiotiques, affectant des mécanismes moléculaires diversifiés et jouant un rôle anti-inflammatoire, anti-apoptotique et anti-angiogénique (Garrido-Mesa, Zarzuelo et Galvez, 2013). Une étude récente a également démontré que la minocycline diminuait la croissance des gliomes en inhibant l'expression de la MT1-MMP (Markovic *et al.*, 2011). Toutefois, le mécanisme de répression de la MT1-MMP par la minocycline est demeuré inconnu. À partir de ces évidences, nous avons donc tenté d'évaluer l'effet de la minocycline sur des processus inflammatoires et autophagiques, mais également de déterminer si son action sur la MT1-MMP est directe, ou si l'action est sur des effecteurs affectant plutôt la transcription de la MT1-MMP. Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que non seulement la minocycline possède des propriétés anti-inflammatoires, mais elle est également en mesure de diminuer le phénotype autophagique induit par la ConA via un mécanisme d'action ciblant la MT1-MMP. En effet, la minocycline est capable de diminuer directement le niveau d'expression génique basal de la MT1-MMP, ce qui a comme répercussion secondaire d'inhiber l'expression de biomarqueurs de l'inflammation et de l'autophagie lors d'une stimulation à la ConA. De plus, la minocycline diminue le niveau de phosphorylation de STAT3 induit par la ConA. Non seulement STAT3 est impliqué dans l'expression de la MT1-MMP, mais il est également un effecteur critique dans la régulation de l'angiogenèse (Chen et Han, 2008). La minocycline inhibe également l'expression de NANOS1, un autre modulateur de la transcription de MT1-MMP. Nous démontrons donc pour la première fois une corrélation importante entre

NANOS1 et MT1-MMP dans le mécanisme d'action de la minocycline suggérant qu'elle cible en premier lieu NANOS1 qui se traduit par une répression transcriptionnelle de la MT1-MMP et de ses fonctions signalétiques (Figure 4.4). Collectivement, les données recueillies au cours de cette étude suggèrent un rôle anti-tumoral de la minocycline dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires.

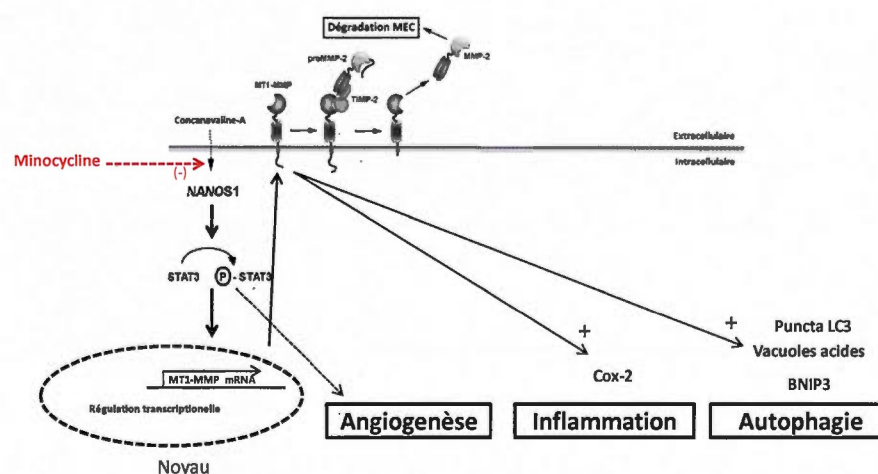


Figure 4.4 : Schéma récapitulatif de l'effet de la minocycline sur la régulation de la MT1-MMP. Dans notre étude, nous montrons que la ConA induit la transcription de la MT1-MMP via une voie de signalisation impliquant NANOS1 et STAT3. La surexpression de la MT1-MMP est associée à l'induction de COX-2 impliqué dans le phénotype inflammatoire, ainsi que l'induction de la formation de vacuoles acides et de BNIP3, deux biomarqueurs caractéristiques du phénotype autophagique. Enfin, nous suggérons que la

minocycline peut inhiber la cascade d'évènements menant au phénotype inflammatoire et autophagique inducible par la ConA en inhibant l'expression génique de NANOS1.

[Adapté de Zgheib et al, 2013]

CONCLUSION

L'importance des MMPs dans le phénotype invasif des hépatomes peut être considérée comme une signature moléculaire du cancer. Certaines, comme la MT1-MMP, se démarquent en jouant un double rôle dans la tumorigenèse en contribuant à la fois à la dégradation de la MEC, et à l'induction de signaux impliqués dans plusieurs voies signalétiques importantes menant à l'autophagie et à la chimiorésistance tumorale. Une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation médiés par la MT1-MMP devient donc nécessaire dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-cancers. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques permettant de réprimer la transcription de MMPs impliquées dans les processus de signalisation associés à la progression et la résistance tumorale pourrait potentialiser l'action anti-cancer en diminuant également la chimiorésistance secondaire. Nous avons donc montré au cours de cette étude le potentiel anti-tumoral de la minocycline par ses propriétés anti-inflammatoires et anti-autophagiques. De plus, nous avons identifié pour la première fois deux nouveaux effecteurs moléculaires (STAT3 et NANOS1) impliqués dans la transcription de la MT1-MMP. Nous mettons également en évidence la participation de NANOS1 dans la phosphorylation de STAT3 induite par la ConA. De façon globale, nous proposons un nouveau mécanisme d'action de la minocycline dans la cascade d'évènements inhibant les fonctions de signalisation de la MT1-MMP en ciblant l'axe NANOS1/STAT3. Collectivement, nos résultats suggèrent donc un potentiel anti-tumoral pour la minocycline dans le traitement des hépatomes humains. La minocycline pourrait diminuer à la fois l'invasion tumorale tout en minimisant le micro-environnement inflammatoire caractéristique des hépatomes. De plus, l'administration de minocycline en combinaison avec un traitement classique pourrait possiblement diminuer des phénomènes de résistance tumorale par autophagie. L'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire permet aussi de réaffirmer le rôle de MT1-MMP à titre d'acteur clé dans la modulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires.

Perspectives dans le traitement du cancer : un rôle pour les antibiotiques ?

Depuis la dernière décennie, le domaine biomédical est en recherche constante de nouveaux agents pharmacologiques capables d'éliminer les cellules cancéreuses tout en préservant un maximum de cellules saines. Le manque de spécificité des agents pharmacologiques est la cause première des limitations au niveau des doses administrées se répercutant par des phénomènes de chimiorésistance secondaire. Les antibiotiques sont depuis des siècles utilisés dans le traitement des infections bactériennes et ciblent la plupart du temps de manière très spécifique, des enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN ou dans la mitose, tuant la bactérie. Hormis leur grande spécificité dans les modèles bactériens, les chercheurs se sont attardés au cours de la dernière décennie au rôle potentiel des antibiotiques dans le traitement contre le cancer. Plusieurs études ont montré des régressions tumorales importantes lors de traitements aux antibiotiques avec un minimum d'effets secondaires, suggérant un grand potentiel dans le traitement de certains cancers dont le cancer du sein (Singha *et al.*, 2013) et du pancréas (Wang *et al.*, 2013). Par exemple, la Gemifloxacin, reconnue pour inhiber l'ADN gyrase des bactéries, a un fort potentiel anti-métastatique dans le cancer du sein chez la souris, en réprimant de façon très spécifique NF- κ B impliqué dans des voies de survie cellulaire (Chen *et al.*, 2013). De plus, il a été démontré que l'optimisation de la structure moléculaire de certains antibiotiques, comme la Novobiocin ayant des propriétés anti-prolifératives, permettait d'accroître jusqu'à 700 fois son efficacité pharmacologique (Zhao *et al.*, 2011). Toutefois, l'optimisation dans le « design » de la Novobiocin n'était alors basée que sur notre compréhension de sa liaison avec la HSP90, et il devient désormais nécessaire de bien connaître toutes les interactions des antibiotiques au niveau moléculaire et d'identifier leurs nouvelles cibles potentielles.

Incidemment dans notre étude, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme d'action de la minocycline dans l'inhibition de l'inflammation et de l'autophagie basé sur la répression de la MT1-MMP. En perspective, l'identification du domaine et ultimement de la séquence d'acide aminée de la MT1-MMP impliquée dans le processus de signalisation régulant l'autophagie et l'inflammation pourrait être effectuée en utilisant des plasmides encodant différentes portions de domaines de délétion de la MT1-MMP. Cette identification

permettrait de cibler et d'inhiber des mécanismes de signalisations autophagiques par des antibiotiques au terme d'une modélisation optimisée, tout en bénéficiant des propriétés anti-inflammatoires de l'agent. La découverte de nouveaux antibiotiques affectant la progression tumorale, ainsi que l'identification de leurs nouvelles cibles spécifiques pourraient ouvrir la porte vers de nouveaux traitements thérapeutiques contre le cancer.

REFERENCES

- Aerts, J. G., et J. P. Hegmans. 2013. «Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer». *Cancer Res*, vol. 73, no 8, p. 2381-2388. NLM.
- Akla, N., Pratt, J. and Annabi, B. (2012) Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 318, 2498-2506
- Alirezai, M., C. C. Kemball et J. L. Whitton. 2011. «Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease». *Eur J Neurosci*, vol. 33, no 2, p. 197-204. NLM.
- Alison, M. R., L. J. Nicholson et W. R. Lin. 2011. «Chronic inflammation and hepatocellular carcinoma». *Recent Results Cancer Res*, vol. 185, p. 135-148. NLM.
- Amos, S. M., C. P. Duong, J. A. Westwood, D. S. Ritchie, R. P. Junghans, P. K. Darcy et M. H. Kershaw. 2011. «Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer». *Blood*, vol. 118, no 3, p. 499-509. NLM.
- Anderson, R. T., J. E. Linnehan, V. Tongbram, K. Keating et L. J. Wirth. 2013. «Clinical, safety, and economic evidence in radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: a systematic literature review». *Thyroid*, vol. 23, no 4, p. 392-407. NLM.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1542, no 1-3, p. 209-220. NLM.

- Ataie-Kachoe, P., Morris, D.L. and Pourgholami, M.H. (2013) Minocycline Suppresses Interleukine-6, Its Receptor System and Signaling Pathways and Impairs Migration, Invasion and Adhesion Capacity of Ovarian Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS ONE*. 8, e60817-e60828
- Baeriswyl, V., et G. Christofori. 2009. «The angiogenic switch in carcinogenesis». *Semin Cancer Biol*, vol. 19, no 5, p. 329-337. NLM.
- Bonnomet, A., Polette, M., Strumane, K., Gilles, C., Dalstein, V., Kileztky, C., Berx, G., van Roy, F., Birembaut, P. and Nawrocki-Raby, B. (2008) The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression. *Oncogene*. 27, 3692-3699
- Berasain, C., J. Castillo, M. J. Perugorria, M. U. Latasa, J. Prieto et M. A. Avila. 2009. «Inflammation and liver cancer: new molecular links». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1155, p. 206-221. NLM.
- Bergers, G., et L. E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 6, p. 401-410. NLM.
- Bertino, G., I. Di Carlo, A. Ardiri, G. S. Calvagno, S. Demma, G. Malaguarnera, N. Bertino, M. Malaguarnera, A. Toro et M. Malaguarnera. 2013. «Systemic therapies in hepatocellular carcinoma: present and future». *Future Oncol*, vol. 9, no 10, p. 1533-1548. NLM.
- Bhatnagar, S., et Y. K. Sarin. 2010. «Scope and limitations of minimal invasive surgery in practice of pediatric surgical oncology». *Indian J Med Paediatr Oncol*, vol. 31, no 4, p. 137-142. NLM.
- Bonnomet, A., M. Polette, K. Strumane, C. Gilles, V. Dalstein, C. Kileztky, G. Berx, F. van Roy, P. Birembaut et B. Nawrocki-Raby. 2008. «The E-cadherin-repressed hNanos1

gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression». *Oncogene*, vol. 27, no 26, p. 3692-3699. NLM.

Breier, G., A. H. Licht, A. Nicolaus, A. Klotzsche, B. Wielockx et Z. Kirsnerova. 2007. «HIF in vascular development and tumour angiogenesis». *Novartis Found Symp*, vol. 283, p. 126-133; discussion 133-128, 238-141. NLM.

Centelles, J. J. 2012. «General aspects of colorectal cancer». *ISRN Oncol*, vol. 2012, p. 139268. NLM.

Cervello, M., et G. Montalto. 2006. «Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma». *World J Gastroenterol*, vol. 12, no 32, p. 5113-5121. NLM.

Chen, S., Rehman, S.K., Zhang, W., Wen, A., Yao, L. and Zhang, J. (2010) Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1806, 220-229.

Chai, S., K. K. To et G. Lin. 2010. «Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines». *Chin Med*, vol. 5, p. 26. NLM.

Chang, C. P., M. C. Yang, H. S. Liu, Y. S. Lin et H. Y. Lei. 2007. «Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model». *Hepatology*, vol. 45, no 2, p. 286-296. NLM.

Chen, S., S. K. Rehman, W. Zhang, A. Wen, L. Yao et J. Zhang. 2010. «Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1806, no 2, p. 220-229. NLM.

Chen, T. C., Y. L. Hsu, Y. C. Tsai, Y. W. Chang, P. L. Kuo et Y. H. Chen. 2013. «Gemifloxacin inhibits migration and invasion and induces mesenchymal-epithelial transition in human breast adenocarcinoma cells». *J Mol Med (Berl)*. NLM.

- Chen, X., W. Liu, J. Wang, X. Wang et Z. Yu. 2002. «STAT1 and STAT3 mediate thrombin-induced expression of TIMP-1 in human glomerular mesangial cells». *Kidney Int*, vol. 61, no 4, p. 1377-1382. NLM.
- Chen, Y., et D. J. Klionsky. 2011. «The regulation of autophagy - unanswered questions». *J Cell Sci*, vol. 124, no Pt 2, p. 161-170. NLM.
- Chen, Z., et Z. C. Han. 2008. «STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis». *Med Res Rev*, vol. 28, no 2, p. 185-200. NLM.
- Chopra, I., et M. Roberts. 2001. «Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 65, no 2, p. 232-260 ; second page, table of contents. NLM.
- Clarke, J. M., et H. I. Hurwitz. 2013. «Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies». *J Gastrointest Oncol*, vol. 4, no 3, p. 253-263. NLM.
- Codogno, P., et A. J. Meijer. 2005. «Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death». *Cell Death Differ*, vol. 12 Suppl 2, p. 1509-1518. NLM.
- Conde-Perezprina, J. C., M. A. Leon-Galvan et M. Konigsberg. 2012. «DNA mismatch repair system: repercussions in cellular homeostasis and relationship with aging». *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2012, p. 728430. NLM.
- Corbel, M., E. Boichot et V. Lagente. 2000. «Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury». *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, no 7, p. 749-754. NLM.
- Coussens, L. M., et Z. Werb. 2002. «Inflammation and cancer». *Nature*, vol. 420, no 6917, p. 860-867. NLM.

- Crotzer, V. L., et J. S. Blum. 2010. «Autophagy and adaptive immunity». *Immunology*, vol. 131, no 1, p. 9-17. NLM.
- Cui, J., Gong, Z. and Shen, H.M. (2013) The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*. 1836, 15-26.
- Cui, Y., D. S. Kim, S. H. Park, J. A. Yoon, S. K. Kim, S. B. Kwon et K. C. Park. 2004. «Involvement of ERK AND p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells». *Chem Phys Lipids*, vol. 129, no 1, p. 43-52. NLM.
- Currie, J. C., S. Fortier, A. Sina, J. Galipeau, J. Cao et B. Annabi. 2007. «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem*, vol. 282, no 11, p. 8142-8149. NLM.
- Danaei, G., S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray et M. Ezzati. 2005. «Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors». *Lancet*, vol. 366, no 9499, p. 1784-1793. NLM.
- Ding, W. X., et X. M. Yin. 2012. «Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis». *Biol Chem*, vol. 393, no 7, p. 547-564. NLM.
- Ding, Z. B., B. Hui, Y. H. Shi, J. Zhou, Y. F. Peng, C. Y. Gu, H. Yang, G. M. Shi, A. W. Ke, X. Y. Wang, K. Song, Z. Dai, Y. H. Shen et J. Fan. 2011. «Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation». *Clin Cancer Res*, vol. 17, no 19, p. 6229-6238. NLM.
- Donnelly, J. G. 2004. «Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response». *Ther Drug Monit*, vol. 26, no 2, p. 231-235. NLM.

- Dunston, C.R., Griffiths, H.R., Lambert, P.A., Staddon, S. and Vernallis, A.B. (2011) Proteomic analysis of the anti-inflammatory action of minocycline. *Proteomics*. 11, 42-51
- Egeblad, M., et Z. Werb. 2002. «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no 3, p. 161-174. NLM.
- Eisenach, P. A., C. Roghi, M. Fogarasi, G. Murphy et W. R. English. 2010. «MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 23, p. 4182-4193. NLM.
- Eming, S. A., T. Krieg et J. M. Davidson. 2007. «Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms». *J Invest Dermatol*, vol. 127, no 3, p. 514-525. NLM.
- Etoh, T., H. Inoue, Y. Yoshikawa, G. F. Barnard, S. Kitano et M. Mori. 2000. «Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness». *Gut*, vol. 47, no 1, p. 50-56. NLM.
- Farias-Eisner, R., F. Teng, M. Oliveira, R. Leuchter, B. Karlan, L. D. Lagasse et J. S. Berek. 1994. «The influence of tumor grade, distribution, and extent of carcinomatosis in minimal residual stage III epithelial ovarian cancer after optimal primary cytoreductive surgery». *Gynecol Oncol*, vol. 55, no 1, p. 108-110. NLM.
- Ferrara, N., H. P. Gerber et J. LeCouter. 2003. «The biology of VEGF and its receptors». *Nat Med*, vol. 9, no 6, p. 669-676. NLM.
- Fisher, J. C., J. W. Gander, M. J. Haley, S. L. Hernandez, J. Huang, Y. J. Chang, T. B. Johung, P. Guarnieri, K. O'Toole, D. J. Yamashiro et J. J. Kandel. 2011. «Inhibition of cyclo-oxygenase 2 reduces tumor metastasis and inflammatory signaling during blockade of vascular endothelial growth factor». *Vasc Cell*, vol. 3, p. 22. NLM.

- Fisher, J. F., et S. Mobashery. 2006. «Recent advances in MMP inhibitor design». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 25, no 1, p. 115-136. NLM.
- Foo, J., et F. Michor. 2010. «Evolution of resistance to anti-cancer therapy during general dosing schedules». *J Theor Biol*, vol. 263, no 2, p. 179-188. NLM.
- Forbes, A. and Lehmann, R. (1998) Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*. 125, 679-690
- Friedl, P., et K. Wolf. 2003. «Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 5, p. 362-374. NLM.
- Garrido-Mesa, N., A. Zarzuelo et J. Galvez. 2013. «Minocycline: far beyond an antibiotic». *Br J Pharmacol*, vol. 169, no 2, p. 337-352. NLM.
- Gee, J., I. L. Lee, H. B. Grossman et A. L. Sabichi. 2008. «Forced COX-2 expression induces PGE(2) and invasion in immortalized urothelial cells». *Urol Oncol*, vol. 26, no 6, p. 641-645. NLM.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D. and Karamanos, N.K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278, 16-27
- Gilligan, T., et P. W. Kantoff. 2002. «Chemotherapy for prostate cancer». *Urology*, vol. 60, no 3 Suppl 1, p. 94-100; discussion 100. NLM.
- Gingras, D. and Béliveau, R. (2010) Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1803, 142-150

- Goldfarb, M., S. Brower et S. D. Schwaitzberg. 2010. «Minimally invasive surgery and cancer: controversies part 1». *Surg Endosc*, vol. 24, no 2, p. 304-334. NLM.
- Gomori, E., J. Pal, B. Kovacs et T. Doczi. 2012. «Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas». *Diagn Pathol*, vol. 7, p. 8. NLM.
- Greenhough, A., H. J. Smartt, A. E. Moore, H. R. Roberts, A. C. Williams, C. Paraskeva et A. Kaidi. 2009. «The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment». *Carcinogenesis*, vol. 30, no 3, p. 377-386. NLM.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899
- Guo, X. L., D. Li, K. Sun, J. Wang, Y. Liu, J. R. Song, Q. D. Zhao, S. S. Zhang, W. J. Deng, X. Zhao, M. C. Wu et L. X. Wei. 2013. «Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of bevacizumab in hepatocarcinoma». *J Mol Med (Berl)*, vol. 91, no 4, p. 473-483. NLM.
- Haas, T. L., D. Stitelman, S. J. Davis, S. S. Apte et J. A. Madri. 1999. «Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium». *J Biol Chem*, vol. 274, no 32, p. 22679-22685. NLM.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2011. «Hallmarks of cancer: the next generation». *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674. NLM.
- Hennings, H., A. B. Glick, D. A. Greenhalgh, D. L. Morgan, J. E. Strickland, T. Tennenbaum et S. H. Yuspa. 1993. «Critical aspects of initiation, promotion, and

progression in multistage epidermal carcinogenesis». *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 202, no 1, p. 1-8. NLM.

Hidden, U., E. Glitzner, M. Ivanisevic, J. Djelmis, C. Wadsack, U. Lang et G. Desoye. 2008. «MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels». *Diabetes*, vol. 57, no 1, p. 150-157. NLM.

Itoh, Y., et M. Seiki. 2004. «MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation». *Trends Biochem Sci*, vol. 29, no 6, p. 285-289. NLM.

Ji, B., P. Jamet, E. G. Perani, P. Bobin et J. H. Grosset. 1993. «Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy». *J Infect Dis*, vol. 168, no 1, p. 188-190. NLM.

Jones, K. L., et A. U. Buzdar. 2004. «A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer». *Endocr Relat Cancer*, vol. 11, no 3, p. 391-406. NLM.

June, C. H. 2007. «Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic». *J Clin Invest*, vol. 117, no 6, p. 1466-1476. NLM.

Kawazoe, H., T. Kubo, N. Iihara, C. Doi, M. Okujyoh, N. Fukuoka, S. Fujimoto, N. Kanaji, S. Bando, T. Ishida, Y. Takiguchi et H. Houchi. 2006. «[Monitoring the side effects of cancer chemotherapy with patients--participation of patients in cancer therapy and sharing patient information]». *Yakugaku Zasshi*, vol. 126, no 8, p. 629-642. NLM.

Kern, M. A., M. M. Schoneweiss, D. Sahi, M. Bahlo, A. M. Haugg, H. U. Kasper, H. P. Dienes, H. Kaferstein, K. Breuhahn et P. Schirmacher. 2004. «Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice». *Carcinogenesis*, vol. 25, no 7, p. 1193-1199. NLM.

- Khare, S., Q. Zhang et J. A. Ibdah. 2013. «Epigenetics of hepatocellular carcinoma: Role of microRNA». *World J Gastroenterol*, vol. 19, no 33, p. 5439-5445. NLM.
- Kim, S.H. and Suh, Y.H. (2009) Minocycline and neurodegenerative diseases *Behavioural Brain Research* 196, 168–179.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet et K. L. Guan. 2011. «AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1». *Nat Cell Biol*, vol. 13, no 2, p. 132-141. NLM.
- Kim, S. H., J. M. Oh, J. H. No, Y. J. Bang, Y. S. Juhn et Y. S. Song. 2009. «Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein». *Carcinogenesis*, vol. 30, no 5, p. 753-757. NLM.
- Kimmelman, A. C. 2011. «The dynamic nature of autophagy in cancer». *Genes Dev*, vol. 25, no 19, p. 1999-2010. NLM.
- Kitadai, Y., Ellis, L.M., Tucker, S.L., Greene, G.F., Bucana, C.D., Cleary, K.R., Takahashi, Y., Tahara, E. and Fidler, I.J. (1996) Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. *Am J Pathol*. 149, 1541-1551
- Komarova, N. L., et D. Wodarz. 2005. «Drug resistance in cancer: principles of emergence and prevention». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 27, p. 9714-9719. NLM.
- Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya et S. Kondo. 2005. «The role of autophagy in cancer development and response to therapy». *Nat Rev Cancer*, vol. 5, no 9, p. 726-734. NLM.
- Kontos, C. K., M. I. Christodoulou et A. Scorilas. 2013. «Apoptosis-related BCL2-Family Members: Key Players in Chemotherapy». *Anticancer Agents Med Chem*. NLM.

- Koontongkaew, S. 2013. «The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas». *J Cancer*, vol. 4, no 1, p. 66-83. NLM.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. (2001) A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15, 2877-2885
- Kozioł, A., M. Martin-Alonso, C. Clemente, P. Gonzalo et A. G. Arroyo. 2012. «Site-specific cellular functions of MT1-MMP». *Eur J Cell Biol*, vol. 91, no 11-12, p. 889-895. NLM.
- Kramer, N., A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschlager et H. Dolznig. 2013. «In vitro cell migration and invasion assays». *Mutat Res*, vol. 752, no 1, p. 10-24. NLM.
- Krug, L. M. 2004. «Vaccine therapy for small cell lung cancer». *Semin Oncol*, vol. 31, no 1 Suppl 1, p. 112-116. NLM.
- Kuballa, P., W. M. Nolte, A. B. Castoreno et R. J. Xavier. 2012. «Autophagy and the immune system». *Annu Rev Immunol*, vol. 30, p. 611-646. NLM.
- Labrie, F. 2010. «Hormonal therapy of prostate cancer». *Prog Brain Res*, vol. 182, p. 321-341. NLM.
- Leber, M. F., et T. Efferth. 2009. «Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)». *Int J Oncol*, vol. 34, no 4, p. 881-895. NLM.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen et J. Keski-Oja. 1998. «Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface». *Biochem J*, vol. 334 (Pt 2), p. 345-353. NLM.

Levine, B. and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27-42

Levine, B., et J. Yuan. 2005. «Autophagy in cell death: an innocent convict?». *J Clin Invest*, vol. 115, no 10, p. 2679-2688. NLM.

Li, J., B. Yang, Q. Zhou, Y. Wu, D. Shang, Y. Guo, Z. Song, Q. Zheng et J. Xiong. 2013. «Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition». *Carcinogenesis*, vol. 34, no 6, p. 1343-1351. NLM.

Liang, X. J., C. Chen, Y. Zhao et P. C. Wang. 2010. «Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology». *Methods Mol Biol*, vol. 596, p. 467-488. NLM.

Libby, P. 2007. «Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease». *Nutr Rev*, vol. 65, no 12 Pt 2, p. S140-146. NLM.

Lin, L., et T. G. Bivona. 2012. «Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients». *Chemother Res Pract*, vol. 2012, p. 817297. NLM.

Lindley, C., J. S. McCune, T. E. Thomason, D. Lauder, A. Sauls, S. Adkins et W. T. Sawyer. 1999. «Perception of chemotherapy side effects cancer versus noncancer patients». *Cancer Pract*, vol. 7, no 2, p. 59-65. NLM.

Liu, B., A. Mao et D. Liu. 2011. «The hypothesis of an effective strategy for resistance of hepatocellular carcinoma to therapy-autophagy». *West Indian Med J*, vol. 60, no 6, p. 666-668. NLM.

- Liu, W.T., Huang, C.Y., Lu, I.C. and Gean, P.W. (2013) Inhibition of glioma growth by minocycline is mediated through endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and autophagic cell death. *Neuro Oncol.* 15, 1127-1141
- Llovet, J. M., A. Burroughs et J. Bruix. 2003. «Hepatocellular carcinoma». *Lancet*, vol. 362, no 9399, p. 1907-1917. NLM.
- Lorin, S., P. Codogno et M. Djavaheri-Mergny. 2008. «[Autophagy: a new concept in cancer research]». *Bull Cancer*, vol. 95, no 1, p. 43-50. NLM.
- Lrhezzioui, J., E. Emery et F. Chapon. 2007. «[Frontal giant cell glioblastoma: radio-induced tumor? Case report and literature review]». *Neurochirurgie*, vol. 53, no 6, p. 486-490. NLM.
- Markovic, D. S., K. Vinnakota, N. van Rooijen, J. Kiwit, M. Synowitz, R. Glass et H. Kettenmann. 2011. «Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression». *Brain Behav Immun*, vol. 25, no 4, p. 624-628. NLM.
- Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth et E. White. 2007. «Role of autophagy in cancer». *Nat Rev Cancer*, vol. 7, no 12, p. 961-967. NLM.
- Maeda, S. and Omata, M. (2008) Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* 99, 836-842
- Markovic, D.S., Vinnakota, K., van Rooijen, N., Kiwit, J., Synowitz, M., Glass, R. and Kettenmann, H. (2011) Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression. *Brain Behav Immun.* 25, 624-628
- Meng, Q., Xu, J., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Greenwald, R.A. and Fan, S. (2000) Influence of chemically modified tetracyclines on proliferation, invasion and

migration properties of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 18, 139-146

Mechetner, E., A. Kyshtoobayeva, S. Zonis, H. Kim, R. Stroup, R. Garcia, R. J. Parker et J. P. Fruehauf. 1998. «Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin». *Clin Cancer Res*, vol. 4, no 2, p. 389-398. NLM.

Medzhitov, R. 2008. «Origin and physiological roles of inflammation». *Nature*, vol. 454, no 7203, p. 428-435. NLM.

Meena, A. S., A. Sharma, R. Kumari, N. Mohammad, S. V. Singh et M. K. Bhat. 2013. «Inherent and acquired resistance to paclitaxel in hepatocellular carcinoma: molecular events involved». *PLoS One*, vol. 8, no 4, p. e61524. NLM.

Misale, S., R. Yaeger, S. Hobor, E. Scala, M. Janakiraman, D. Liska, E. Valtorta, R. Schiavo, M. Buscarino, G. Siravegna, K. Bencardino, A. Cercek, C. T. Chen, S. Veronese, C. Zanon, A. Sartore-Bianchi, M. Gambacorta, M. Gallicchio, E. Vakiani, V. Boscaro, E. Medico, M. Weiser, S. Siena, F. Di Nicolantonio, D. Solit et A. Bardelli. 2012. «Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer». *Nature*, vol. 486, no 7404, p. 532-536. NLM.

Mizushima, N. 2007. «Autophagy: process and function». *Genes Dev*, vol. 21, no 22, p. 2861-2873. NLM.

Moreira, I. S., P. A. Fernandes et M. J. Ramos. 2007. «Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition--a critical review». *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 7, no 2, p. 223-245. NLM.

Moss, N. M., Y. Liu, J. J. Johnson, P. Debiase, J. Jones, L. G. Hudson, H. G. Munshi et M. S. Stack. 2009. «Epidermal growth factor receptor-mediated membrane type 1 matrix

metalloproteinase endocytosis regulates the transition between invasive versus expansive growth of ovarian carcinoma cells in three-dimensional collagen». *Mol Cancer Res*, vol. 7, no 6, p. 809-820. NLM.

Moustacchi, E. 1998. «[Molecular mechanisms of carcinogenesis: the role of systems of DNA repair]». *Bull Acad Natl Med*, vol. 182, no 1, p. 33-46; discussion 47. NLM.

Mysliwiec, P., et B. Kedra. 2008. «[Causes of delayed diagnosis of pancreatic cancer. Own study and proposed algorithm]». *Przegl Lek*, vol. 65, no 7-8, p. 345-348. NLM.

Nakawaga, H. and Maeda, S. (2012) Inflammation- and stress-related signaling pathways in Hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 18, 4071-4081

Nelson, C. J., J. S. Lee, M. C. Gamboa et A. J. Roth. 2008. «Cognitive effects of hormone therapy in men with prostate cancer: a review». *Cancer*, vol. 113, no 5, p. 1097-1106. NLM.

Nemunaitis, J. J. 2009. «Gene immunotherapy for non-small cell lung cancer». *Methods Mol Biol*, vol. 542, p. 499-514. NLM.

Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem*, vol. 282, no 21, p. 15690-15699. NLM.

Overall, C. M., et C. Lopez-Otin. 2002. «Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era». *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no 9, p. 657-672. NLM.

Proulx-Bonneau, S., Pratt, J. and Annabi, B. (2011) A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 104, 33-43

- Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M. and Thompson, E.W. (1997) MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 15, 111-120. Erratum in: *Clin Exp Metastasis*. 15, 338
- Pan, M. H., C. S. Lai et C. T. Ho. 2010. «Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids». *Food Funct*, vol. 1, no 1, p. 15-31. NLM.
- Panga, T., Wang, J., Benickya, J. and Saavedra, J.M. (2012) Minocycline ameliorates LPS-induced inflammation in human monocytes by novel mechanisms including LOX-1, Nur77 and LITAF inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 1820, 503-510
- Papetti, M., et I. M. Herman. 2002. «Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 282, no 5, p. C947-970. NLM.
- Peng, Y. F., Y. H. Shi, Y. H. Shen, Z. B. Ding, A. W. Ke, J. Zhou, S. J. Qiu et J. Fan. 2013. «Promoting Colonization in Metastatic HCC Cells by Modulation of Autophagy». *PLoS One*, vol. 8, no 9, p. e74407. NLM.
- Pichler, M., G. C. Hutterer, T. F. Chromecki, J. Jesche, K. Kampel-Kettner, P. Rehak, K. Pummer et R. Zigeuner. 2012. «Histologic tumor necrosis is an independent prognostic indicator for clear cell and papillary renal cell carcinoma». *Am J Clin Pathol*, vol. 137, no 2, p. 283-289. NLM.
- Polette, M., Gilles, C., Nawrocki-Raby, B., Lohi, J., Hunziker, W., Foidart, J.M. and Birembaut, P. (2005) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 65, 7691-7698

- Pourgholami, M.H., Ataie-Kachoei, P., Badar, S. and Morris, D.L. (2013) Minocycline inhibits malignant ascites of ovarian cancer through targeting multiple signaling pathways. *Gynecol Oncol.* 129, 113-119
- Pourgholami, M.H., Mekkawy, A.H., Badar, S. and Morris, D.L. (2012) Minocycline inhibits growth of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 125, 433-440
- Pratt, J., R. Roy et B. Annabi. 2012. «Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells». *Glycobiology*, vol. 22, no 9, p. 1245-1255. NLM.
- Pugh, C. W., et P. J. Ratcliffe. 2003. «Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system». *Nat Med*, vol. 9, no 6, p. 677-684. NLM.
- Quesnel, B. 2013. «Tumor dormancy: long-term survival in a hostile environment». *Adv Exp Med Biol*, vol. 734, p. 181-200. NLM.
- Radisky, E. S., et D. C. Radisky. 2010. «Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer». *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, vol. 15, no 2, p. 201-212. NLM.
- Rahman, R., G. M. Hammoud, A. A. Almashhrawi, K. T. Ahmed et J. A. Ibdah. 2013. «Primary hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: An update». *World J Gastrointest Oncol*, vol. 5, no 9, p. 186-194. NLM.
- Rajarajeswaran, P., et R. Vishnupriya. 2009. «Exercise in cancer». *Indian J Med Paediatr Oncol*, vol. 30, no 2, p. 61-70. NLM.
- Ranasinghe, H. S., A. Scheepens, E. Sirimanne, M. D. Mitchell, C. E. Williams et M. Fraser. 2012. «Inhibition of MMP-9 activity following hypoxic ischemia in the developing

brain using a highly specific inhibitor». *Dev Neurosci*, vol. 34, no 5, p. 417-427. NLM.

Rodrigues, S., E. Bruyneel, C. M. Rodrigue, E. Shahin et C. Gespach. 2004. «[Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis]». *Bull Cancer*, vol. 91 Suppl 2, p. S61-76. NLM.

Romi, F., G. Helgeland et N. E. Gilhus. 2012. «Serum levels of matrix metalloproteinases: implications in clinical neurology». *Eur Neurol*, vol. 67, no 2, p. 121-128. NLM.

Rosenfeldt, M.T. and Ryan, K.M. (2011) The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 32, 955-963

Rosenberg, S. A. 2011. «Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know». *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 8, no 10, p. 577-585. NLM.

Rossello, A., E. Nuti, E. Orlandini, P. Carelli, S. Rapposelli, M. Macchia, F. Minutolo, L. Carbonaro, A. Albini, R. Benelli, G. Cercignani, G. Murphy et A. Balsamo. 2004. «New N-arylsulfonyl-N-alkoxyaminoacetohydroxamic acids as selective inhibitors of gelatinase A (MMP-2)». *Bioorg Med Chem*, vol. 12, no 9, p. 2441-2450. NLM.

Rozañov, D. V., A. Y. Savinov, R. Williams, K. Liu, V. S. Golubkov, S. Krajewski et A. Y. Strongin. 2008. «Molecular signature of MT1-MMP: transactivation of the downstream universal gene network in cancer». *Cancer Res*, vol. 68, no 11, p. 4086-4096. NLM.

Rubinstein AD and Kimchi A. (2012) Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*. 125, 5259-5268

Rundhaug, J. E. 2005. «Matrix metalloproteinases and angiogenesis». *J Cell Mol Med*, vol. 9, no 2, p. 267-285. NLM.

- Saikali, Z., et G. Singh. 2003. «Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis». *Anticancer Drugs*, vol. 14, no 10, p. 773-778. NLM.
- Saleh, F., W. Renno, I. Klepacek, G. Ibrahim, S. Asfar, H. Dashti, P. Romero, A. Dashti et A. Behbehani. 2005. «Melanoma immunotherapy: past, present, and future». *Curr Pharm Des*, vol. 11, no 27, p. 3461-3473. NLM.
- Schildkraut, J. M., E. S. Iversen, L. Akushevich, R. Whitaker, R. C. Bentley, A. Berchuck et J. R. Marks. 2013. «Molecular signatures of epithelial ovarian cancer: analysis of associations with tumor characteristics and epidemiologic risk factors». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 22, no 10, p. 1709-1721. NLM.
- Schuster, M., A. Nechansky et R. Kircheis. 2006. «Cancer immunotherapy». *Biotechnol J*, vol. 1, no 2, p. 138-147. NLM.
- Schwab, J. M., H. J. Schluesener, R. Meyermann et C. N. Serhan. 2003. «COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?». *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 69, no 5, p. 339-343. NLM.
- Seals, D. F., et S. A. Courtneidge. 2003. «The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions». *Genes Dev*, vol. 17, no 1, p. 7-30. NLM.
- Seibert, K., et J. L. Masferrer. 1994. «Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation». *Receptor*, vol. 4, no 1, p. 17-23. NLM.
- Sen, T., A. Dutta et A. Chatterjee. 2010. «Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the

human breast cancer cell line MDA-MB-231». *Anticancer Drugs*, vol. 21, no 6, p. 632-644. NLM.

Shen, H. M., et P. Codogno. 2011. «Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?». *Autophagy*, vol. 7, no 5, p. 457-465. NLM.

Shibuya, M. 2006. «Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis». *J Biochem Mol Biol*, vol. 39, no 5, p. 469-478. NLM.

Shieh, J.M., Huang, T.F., Hung, C.F., Chou, K.H., Tsai, Y.J. and Wu, W.B. (2010) Activation of c-Jun N-terminal kinase is essential for mitochondrial membrane potential change and apoptosis induced by doxycycline in melanoma cells. *Br J Pharmacol*. 160, 1171-1184

Shiomi, T., et Y. Okada. 2003. «MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 22, no 2-3, p. 145-152. NLM.

Sina, A., S. Lord-Dufour et B. Annabi. 2009. «Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation». *Cancer Lett*, vol. 279, no 2, p. 171-176. NLM.

Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao et B. Annabi. 2010. «The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway». *J Cell Commun Signal*, vol. 4, no 1, p. 31-38. NLM.

Singha, P. K., S. Pandeswara, M. A. Venkatachalam et P. Saikumar. 2013. «Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death». *Cell Death Dis*, vol. 4, p. e457. NLM.

Song, Y.J., Zhang, S.S., Guo, X.L., Sun, K., Han, Z.P., Li, R., Zhao, Q.D., Deng, W.J., Xie,

- X.Q., Zhang, J.W., Wu, M.C. and Wei, L.X. (2013) Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 339, 70-81
- Soulié P, Carrozzino F, Pepper M.S., Strongin A.Y., Poupon M.F. and Montesano R. (2005) Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells. *Oncogene.* 24, 1689-1697
- Sounni, N. E., A. Paye, L. Host et A. Noel. 2011. «MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis». *Front Pharmacol*, vol. 2, p. 111. NLM.
- Strumane, K., Bonnomet, A., Stove, C., Vandenbroucke, R., Nawrocki-Raby, B., Bruyneel, E., Mareel, M., Birembaut, P., Berx, G. and van Roy, F. (2006) E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 66, 10007-10015
- Su, M., Y. Mei et S. Sinha. 2013. «Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer». *J Oncol*, vol. 2013, p. 102735. NLM.
- Sun, J. 2010. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells». *J Signal Transduct*, vol. 2010, p. 985132. NLM.
- Sun, K., Deng, W., Zhang, S., Cai, N., Jiao, S., Song, J. and Wei, L. (2013) Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci.* 3, 35
- Suyama, E., H. Kawasaki, R. Wadhwa et K. Taira. 2004. «Cell migration and metastasis as targets of small RNA-based molecular genetic analyses». *J Muscle Res Cell Motil*, vol. 25, no 4-5, p. 303-308. NLM.

- Swampillai, A.L., Salomoni, P. and Short, S.C. (2012) The role of autophagy in clinical practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 24, 387-395
- Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki et H. Sato. 2003. «Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 304, no 1, p. 160-166. NLM.
- Tili, E., J. J. Michaille, D. Wernicke, H. Alder, S. Costinean, S. Volinia et C. M. Croce. 2011. «Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 108, no 12, p. 4908-4913. NLM.
- Toshima, T., K. Shirabe, Y. Matsumoto, S. Yoshiya, T. Ikegami, T. Yoshizumi, Y. Soejima, T. Ikeda et Y. Maehara. 2013. «Autophagy enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of mitochondrial beta-oxidation». *J Gastroenterol*. NLM.
- Toth, M., I. Chvyrkova, M. M. Bernardo, S. Hernandez-Barrantes et R. Fridman. 2003. «Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 308, no 2, p. 386-395. NLM.
- Ugiagbe, E. E., et M. O. Udoh. 2013. «The histopathological pattern of liver biopsies at the University of Benin Teaching Hospital». *Niger J Clin Pract*, vol. 16, no 4, p. 526-529. NLM.
- van den Bogert, C., Dontje, B.H. and Kroon, A.M. (1985) The antitumour effect of doxycycline on a T-cell leukaemia in the rat. *Leuk Res* 9, 617-623
- van den Bogert, C., Dontje, B.H., Holtrop, M., Melis, T.E., Romijn, J.C., van Dongen, J.W. and Kroon, A.M. (1986) Arrest of the proliferation of renal and prostate carcinomas of human origin by inhibition of mitochondrial protein synthesis. *Cancer Res*. 46, 3283-3289

- Vinnakota, K., Hu, F., Ku, M.C., Georgieva, P.B., Szulzewsky, F., Pohlmann, A., Waiczies, S., Waiczies, H., Niendorf, T., Lehnardt, S., Hanisch, U.K., Synowitz, M., Markovic, D., Wolf, S.A., Glass, R. and Kettenmann, H. (2013) Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion. *Neuro Oncol.* 15, 1457-1468
- Wang, J. C., M. Thiere, D. Henne-Bruns, U. Knippschild et M. Kornmann. 2013. «Inhibition of pancreatic cancer cell growth in vivo using a tetracycline-inducible cyclin D1 antisense expression system». *Pancreas*, vol. 42, no 1, p. 141-148. NLM.
- Watanabe, A., Hoshino, D., Koshikawa, N., Seiki, M., Suzuki, T. and Ichikawa, K. (2013) Critical role of transient activity of MT1-MMP for ECM degradation in invadopodia. *PLoS Comput Biol.* 9, e1003086
- West, E. E., H. T. Jin, A. U. Rasheed, P. Penaloza-Macmaster, S. J. Ha, W. G. Tan, B. Youngblood, G. J. Freeman, K. A. Smith et R. Ahmed. 2013. «PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells». *J Clin Invest*, vol. 123, no 6, p. 2604-2615. NLM.
- Wieser, V., R. Gerner, A. R. Moschen et H. Tilg. 2013. «Liver complications in inflammatory bowel diseases». *Dig Dis*, vol. 31, no 2, p. 233-238. NLM.
- Wirtz, D., K. Konstantopoulos et P. C. Searson. 2011. «The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis». *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no 7, p. 512-522. NLM.
- Wu, G., J. Luo, J. S. Rana, R. Laham, F. W. Sellke et J. Li. 2006. «Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells». *Cardiovasc Res*, vol. 69, no 2, p. 512-519. NLM.

- Wu, Y., S. Antony, J. L. Meitzler et J. H. Doroshow. 2013. «Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers». *Cancer Lett.* NLM.
- Wu, Y. T., H. L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M. R. Wenk, C. N. Ong, P. Codogno et H. M. Shen. 2010. «Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase». *J Biol Chem*, vol. 285, no 14, p. 10850-10861. NLM.
- Xu, M., et Y. Z. Wang. 2013. «miR133a suppresses cell proliferation, migration and invasion in human lung cancer by targeting MMP14». *Oncol Rep*, vol. 30, no 3, p. 1398-1404. NLM.
- Yamaguchi, H., J. Wyckoff et J. Condeelis. 2005. «Cell migration in tumors». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 17, no 5, p. 559-564. NLM.
- Yamamoto, H., S. Kakuta, T. M. Watanabe, A. Kitamura, T. Sekito, C. Kondo-Kakuta, R. Ichikawa, M. Kinjo et Y. Ohsumi. 2012. «Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation». *J Cell Biol*, vol. 198, no 2, p. 219-233. NLM.
- Yan, C., et D. D. Boyd. 2007. «Regulation of matrix metalloproteinase gene expression». *J Cell Physiol*, vol. 211, no 1, p. 19-26. NLM.
- Yang., C.C., Zhu, L.F., Xu, X.H., Ning, T.Y., Ye, J.H. and Liu, L.K. (2013) Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *BMC Cancer*. 13, 171
- Yang, Z. J., C. E. Chee, S. Huang et F. A. Sinicrope. 2011. «The role of autophagy in cancer: therapeutic implications». *Mol Cancer Ther*, vol. 10, no 9, p. 1533-1541. NLM.

- Yao, J. S., F. Shen, W. L. Young et G. Y. Yang. 2007. «Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration». *Neurochem Int*, vol. 50, no 3, p. 524-530. NLM.
- Yock, T. I., et P. A. Caruso. 2012. «Risk of second cancers after photon and proton radiotherapy: a review of the data». *Health Phys*, vol. 103, no 5, p. 577-585. NLM.
- Zaman, K., N. Ketterer, D. Vulliemmoz, R. Stupp et S. Leyvraz. 2005. «[New systemic therapies in oncology]». *Rev Med Suisse*, vol. 1, no 20, p. 1361-1362, 1364-1365. NLM.
- Zetter, B. R. 2008. «The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research». *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no 8, p. 647-654. NLM.
- Zgheib, A., E. Pelletier-Bonnier, L. C. Levros, Jr. et B. Annabi. 2013. «Selective JAK/STAT3 signalling regulates transcription of colony stimulating factor-2 and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells». *Cytokine*, vol. 63, no 2, p. 187-193. NLM.
- Zgheib, A., Lamy, S. and Annabi, B. (2013) Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 288, 13378-13386
- Zhang, H., M. Qi, S. Li, T. Qi, H. Mei, K. Huang, L. Zheng et Q. Tong. 2012. «microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells». *Mol Cancer Ther*, vol. 11, no 7, p. 1454-1466. NLM.
- Zhang, X., J. Zhang, X. Yang et X. Han. 2007. «Several transcription factors regulate COX-2 gene expression in pancreatic beta-cells». *Mol Biol Rep*, vol. 34, no 3, p. 199-206. NLM.

Zhao, H., A. C. Donnelly, B. R. Kusuma, G. E. Brandt, D. Brown, R. A. Rajewski, G. Vielhauer, J. Holzbeierlein, M. S. Cohen et B. S. Blagg. 2011. «Engineering an antibiotic to fight cancer: optimization of the novobiocin scaffold to produce anti-proliferative agents». *J Med Chem*, vol. 54, no 11, p. 3839-3853. NLM.

Zucker, S., et J. Cao. 2009. «Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: ready for prime time?». *Cancer Biol Ther*, vol. 8, no 24, p. 2371-2373. NLM.